



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

[Ò ≈]

Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA

**PAPEL DE LOS CETÁCEOS MEDITERRÁNEOS EN EL
CICLO VITAL DE LOS CESTODOS TETRAFILÍDEOS:
EVIDENCIAS MORFOLÓGICAS, ECOLÓGICAS Y
MOLECULARES**

TESIS DOCTORAL

Por

Celia Agustí Ridaura

Directores

Juan Antonio Raga Esteve

Francisco Javier Aznar Avendaño

Valencia, Octubre 2006

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre ...25903.....

DATA11-I-2007.....

SIGNATURA

Biblioteca

Nº LIBIS: 29 cm

119909433

UMI Number: U607710

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607710

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



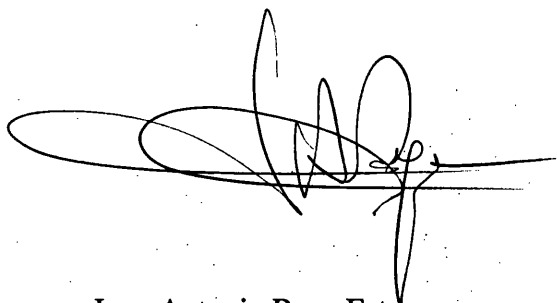
ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

JUAN ANTONIO RAGA ESTEVE, Profesor Titular del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, y

FRANCISCO JAVIER AZNAR AVENDAÑO, Investigador del programa “Ramón y Cajal” en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València

CERTIFICAN: que Celia Agustí Ridaura ha realizado bajo nuestra dirección y con el mayor aprovechamiento el trabajo de investigación recogido en esta memoria, y que lleva por título: “Papel de los cetáceos mediterráneos en el ciclo vital de los cestodos tetrafilídeos: evidencias morfológicas, ecológicas y moleculares”, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, expedimos el presente certificado en Burjassot, a 2 de Octubre de 2006

A stylized handwritten signature in black ink, featuring a large loop at the beginning and a long horizontal stroke at the end.

Juan Antonio Raga Esteve

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of a large 'F' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Francisco Javier Aznar Avendaño

A mi familia, en todas sus dimensiones

Al recuerdo de Misericordia



Foto portada: Josep Cardá

SUMMARY

The life cycle of cestodes belonging to the Tetraphyllidea is poorly known; indeed, no complete data on the cycle is available from any species of this order. The adult stage infects the spiral valve of sharks, skates and chimaeras, and larvae occur in a number of marine animals (among others, copepods, gastropods, pelecypods, teleosts and cephalopods) that appear to act as intermediate and/or paratenic hosts. The reproductive organs of the adult has a fairly homogeneous morphology, but the attachment organ (scolex) exhibits a great variety of structures and shape. For this reason, characters from the scolex are used in the diagnosis of families, and even genera, within this order. In contrast, the scolex of tetraphyllidean larvae has a uniform morphology lacking the character richness of the adult scolex; this makes their taxonomic assignation very difficult, with few exceptions.

Pinnipeds, and particularly cetaceans, are common hosts for tetraphyllidean cestode larvae worldwide. Two larval types, *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*, appear only in marine mammals and have a characteristic cystic morphology (merocercoid). *P. delphini* and *M. grimaldii* occur in the subcutaneous blubber and the peritoneum of the abdominal cavity, respectively. Although both larval types are known since the last two centuries, there are surprisingly few accurate descriptions of the scolex. As in the majority of tetraphyllidean larvae, the specific identity of these larvae is unknown. Some authors have recognised different morphotypes for *P. delphini*, speculating that they could represent different species. On the other hand, the role of marine mammals in the life cycles of these species has largely been discussed. Some authors have suggested that *P. delphini* and *M. grimaldii* could use marine mammals as intermediate host to infect the definitive hosts, probably large pelagic sharks.

Other types of tetraphyllidean larvae have been reported more sporadically in the digestive tract and hepatopancreatic ducts of some marine mammals. Although accurate descriptions of these larvae are very scarce, they probably are plerocercoids according to the information available. These larvae have been suggested to be previous stages of *P. delphini* and *M. grimaldii*.

The basic gaps in the knowledge of the biology of tetraphyllidean species infecting marine mammals pose many questions that this study attempts to answer. In particular, the aims of the present investigation are the following:

1. To characterize morphologically the tetraphyllidean larvae that usually infect cetaceans and pinnipeds. This goal was achieved throughout a detailed study of structures based on light

microscopy, scanning electron microscopy and histological techniques, as well as using morphometric analysis.

2. To investigate whether each morphotype corresponds to a different species and to ascertain their specific identity, and, therefore, to elucidate whether there is some ontogenetic relationship among the different larval types. These three questions were investigated using molecular markers.
3. Finally, to study whether marine mammals play a significant role in the life cycle of these cestode species. In this case we used data from phylogenetic relationships among tetraphyllideans (including larvae of marine mammals) coupled with ecological data (habitat selection inside the host body, and infection patterns in marine mammals from different habitats).

In the present study we analysed 4 cetacean species from the Western Mediterranean (50 striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, 8 Risso's dolphins, *Grampus griseus*, 4 bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, and 1 Cuvier's beaked whale, *Ziphius cavirostris*). Three tetraphyllidean larval types were detected: the merocercoids *P. delphini* and *M. grimaldii* in striped, Risso's and bottlenose dolphins, and several plerocercoids in the digestive system of the three host species mentioned and in the Cuvier's beaked whale.

A detailed analysis of the morphology of plerocercoids from these hosts was performed, and those not described in the literature were requested from several museums for their examination. The analysis showed that, regardless of host species and geographical locality, there are two basic types of tetraphyllidean plerocercoids in marine mammals analysed to date. Both share a similar morphology (lanceolate body and scolex with an apical sucker and 4 monolocular bothridia, each one bearing an accessory sucker), but can be distinguished largely by size differences; hence the names 'small' and 'large' that we propose to differentiate them. The morphometric variables that best separate both groups are body length and bothridium width.

The general morphology of specimens of *P. delphini* and *M. grimaldii* found in our sample fits well with the previous descriptions of these merocercoids in other hosts and geographic localities, except in the structure of the apical organ. The variability we observed suggests that the apical organ degenerates at the merocercoid stage and might disappear in the adult stage. On the other hand, we found, for the first time, 9 specimens of *P. delphini* showing early proglottization. The most developed proglottides bore genital primordia and the scolex morphology was very similar to that of the non-proglottized *P. delphini* from the same host, except in that the scolex structures were larger in the proglottized specimens.

We analysed for the first time the tegument of *P. delphini*, *M. grimaldii*, and the ‘small’ and ‘large’ plerocercoids. The tegument is fully covered with microtriches of 4 basic types, i.e., filitriches, blade-like spinitriches, and two new types, cone-shaped spinitriches with two parallel small projections of equal length at the apex, and crowned cylindrical spinitriches with 6-7 small papillae forming a crown at the apex. The morphology and distribution pattern of microtriches in ‘small’ and ‘large’ plerocercoids are relatively similar to those of other tetraphyllidean plerocercoids described in the literature: the scolex and the body are covered with blade-like spinitriches of different size, except in the apical sucker, where only filitriches are found. However, merocercoids exhibit a greater variety of microtriches, bearing filitriches and blade-like spinitriches on different scolex regions and on the filament, and cone-shaped spinitriches (*M. grimaldii*) or crowned cylindrical spinitriches (*P. delphini*) on the distal surface of the bothridial loculus. Apart from microtriches, structures with a cilium-like morphology are observed on the adherent or distal surface of the bothridium, including the accessory sucker, of the 4 larval types, and on the apical sucker of plerocercoids. These cilium-like structures are surrounded by numerous filitriches in the case of merocercoids. A sensory function is usually attributed to these cilium-like structures.

The D2 variable region (~650 bp) of the nuclear gen 1srDNA (LSU) of *P. delphini*, *M. grimaldii* and the ‘small’ and ‘large’ plerocercoids were sequenced for phylogenetic analysis. This analysis showed 4 unique LSU signatures corresponding with the 4 morphological types regardless of host species and intrahost microhabitat. The inclusion of these sequences in a partial phylogenetic tree of the Tetraphyllidea showed that the 4 larval types formed a monophyletic clade together with *Clistobothrium montaukensis*. The small genetic distances observed among these taxa seem to indicate that they represent different, but congeneric species, although in the case of ‘small’ plerocercoids and *M. grimaldii* this distance is only 1 bp, suggesting intraspecific differences. According with these results: (1) each merocercoid type represent a single species, although some morphological variability was observed; this cast doubt on previous suggestions that the morphological variability may reflect interspecific differences; (2) contrary to previous suggestions, the ‘small’ plerocercoid is not the earlier stage of development of the ‘large’ plerocercoid; (3) contrary to previous suggestions, ‘large’ plerocercoid is not the earlier stage of *P. delphini* nor *M. grimaldii*; (4) the ‘small’ plerocercoid might be the previous stage of *M. grimaldii*, but we do not know if it could also be the plerocercoid stage of *P. delphini*. On the other hand, the Bayesian analysis indicated that *P. delphini* is far separated from *Phyllobothrium lactuca*, the type species of the genus *Phyllobothrium*.

Several authors have shown that the morphology and distribution of microtriches on the scolex of adult cestodes are useful to differentiate species. Our study shows that the morphological and molecular divergence between *P. delphini* and *M. grimaldii* is associated with differences in the

microthrix morphology at the merocercoid stage. However, microtriches of the plerocercoids thus far analysed (including those of the present study) present a fairly homogeneous morphology regardless of the species; therefore, they lack a diagnostic value at this stage of development.

In the striped, Risso's and bottlenose dolphins, the 4 larval types had prevalences and intensities from moderate to high. In addition, each larval type occurred predictably in specific microhabitats, regardless of the host species: *P. delphini* in the subcutaneous blubber; *M. grimaldii* in the peritoneum and mesenteries of the abdominal cavity (in both larvae, the main concentration of individuals occurred in the anal-genital region); the 'small' and 'large' plerocercoids in the lumen of the stomach chambers and intestine, although 'large' plerocercoids tended to accumulate inside the anal crypts and in the hepatopancreatic ducts (except in the last location in bottlenose dolphins), and 'small' plerocercoids burrowed the mucous layer of the pyloric stomach, terminal colon and rectum. In the latter microhabitats there are well developed lymphatic nodules, thus 'small' plerocercoids could use the lymphatic system to reach the peritoneum and mesenteries (and perhaps the blubber) where they would transform into the merocercoid stage.

An exhaustive bibliographic search revealed two major infection patterns of tetraphyllidean larvae in cetaceans and pinnipeds worldwide. These larvae usually infect marine mammals with pelagic habits and feeding on fishes and/or cephalopods.

Overall, the morphological, molecular and ecological data suggest that marine mammals are intermediate hosts for *P. delphini* and *M. grimaldii*, and might act at least as paratenic hosts for the 'large' plerocercoids. This hypothesis is based on the following lines of evidence: (1) since merocercoids present an specialised cystic structure, they must suffer a ontogenetic change inside marine mammals; (2) the molecular analysis shows that all larval types are close relatives of *C. montaukensis*, a parasite of large pelagic sharks of the Lamnidae, which usually feed on marine mammals; (3) these larvae usually infect cetaceans and pinnipeds in the pelagic realm; (4) in the cetacean species analysed, merocercoids and plerocercoids were found with prevalences and intensities of parasitism from moderate to high and occurred in predictable microhabitats within the host.

From an evolutionary point of view, we suggest that marine mammals were incorporated in the life cycles of some tetraphyllidean species through a 'downward incorporation' process. The original cycle probably included invertebrates, teleosts and sharks, but these tetraphyllidean could accrue further advantages by infecting mammals when the latter colonized oceanic habitats. These mammals began to feed on marine invertebrates and teleosts, being at the same time potential preys for some sharks. The main advantages for the parasite would be the following: (1) marine mammals

would act as accumulators of the 3 larval types, enhancing their probability of transmission to the definitive host; (2) the recruitment of many larvae in a single intermediate host would increase the possibility of finding a mate and favouring the larval genotype mixing in the definitive host; (3) the larger size and longevity of the new intermediate mammal host could allow the larvae to reach a greater degree of development, being thus able to reproduce immediately upon arrival to the definitive host.

RESUMEN

El ciclo vital de los cestodos del orden Tetraphyllidea es en gran medida desconocido y, de hecho, no se ha descrito ningún ciclo completo hasta la fecha para ninguna especie de este orden. Se sabe que el estado adulto parasita la válvula espiral de tiburones, rayas y quimeras y que multitud de animales marinos (copépodos, gasterópodos, pelecípodos, teleósteos y cefalópodos) pueden actuar como hospedadores intermediarios y/o paraténicos. Los adultos presentan una uniformidad morfológica en los órganos reproductores pero muestran una gran variedad de formas en su órgano de fijación (escólex). De hecho, son los caracteres del escólex los que se utilizan para la diagnosis de familias, e incluso géneros, dentro de este orden. En cambio, las larvas de tetrafilídeos presentan escasa diferenciación morfológica y no poseen la riqueza de caracteres del escólex del adulto, por lo que, salvo excepciones, su asignación taxonómica es muy difícil.

Los mamíferos marinos son también hospedadores habituales de larvas de cestodos tetrafilídeos en todo el mundo. Dos tipos de larvas, *Phyllobothrium delphini* y *Monorygma grimaldii*, muestran una morfología quística característica (merocercoide) que sólo se da en mamíferos marinos. *P. delphini* y *M. grimaldii* aparecen en la grasa subcutánea y peritoneo de la cavidad abdominal, respectivamente, de la mayoría de especies de cetáceos y algunas de pinnípedos. A pesar de que ambas larvas se conocen desde hace mucho tiempo, existen todavía muy pocas descripciones detalladas del escólex. Como ocurre con la mayoría de larvas de tetrafilídeos, no se conoce la identidad específica de estas larvas. Algunos autores han reconocido diferentes morfotipos de *P. delphini*, sugiriendo que éstos podrían representar diferentes especies. Por otro lado, se ha especulado mucho sobre el papel que juegan los mamíferos marinos en el ciclo vital de estas especies. Algunos autores han sugerido que *P. delphini* y *M. grimaldii* podrían usar los mamíferos marinos como hospedadores intermediarios para infectar a los definitivos, probablemente grandes tiburones pelágicos.

Otros tipos de larvas de tetrafilídeos se han citado de forma más ocasional en el tracto digestivo y conductos hepatopancreáticos de algunos mamíferos marinos. Estas larvas se han descrito con detalle muy raramente pero, de acuerdo con la información disponible, parecen ser del tipo plerocercario. Al igual que ocurre con los merocercoides, su identidad específica es desconocida, aunque se ha sugerido que podrían ser los estados previos de *P. delphini* y *M. grimaldii*.

Estas lagunas en el conocimiento de la biología de las especies de tetrafilídeos que se encuentran en los mamíferos marinos suscitan muchos interrogantes a los que trata de dar respuesta este trabajo. En concreto, los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Caracterizar morfológicamente las larvas de cestodos tetrafilídeos que parasitan habitualmente a cetáceos y pinnípedos. Este objetivo se desarrolla mediante el estudio detallado de las estructuras utilizando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y técnicas histológicas, así como un análisis morfométrico.
2. Averiguar si cada morfotipo corresponde a una especie diferente, conocer su identidad específica, y dilucidar por tanto si existe alguna relación ontogenética entre los diferentes tipos de larvas. Estas tres cuestiones se investigan utilizando marcadores moleculares.
3. Por último, averiguar si los mamíferos marinos desempeñan o no un papel significativo en el ciclo vital de estas especies de cestodos. Para ello se conjugan datos sobre las relaciones filogenéticas entre tetrafilídeos (incluyendo las larvas que aparecen en mamíferos marinos) con datos ecológicos (la selección de hábitat dentro del hospedador, y los patrones de infección en los mamíferos marinos de diferentes ambientes).

Para el desarrollo del presente estudio se analizaron 4 especies de cetáceos del Mediterráneo Occidental (50 delfines listados, *Stenella coeruleoalba*, 8 calderones grises, *Grampus griseus*, 4 delfines mulares, *Tursiops truncatus*, y 1 zifio de Cuvier, *Ziphius cavirostris*). Se detectaron 3 tipos de larvas de cestodos tetrafilídeos en dichos hospedadores: los merocercoides *P. delphini* y *M. grimaldii* en el delfín listado, delfín mular y calderón gris, y diversos plerocercoides en el aparato digestivo de las 3 especies de delfines mencionadas y en el zifio de Cuvier.

Se describió en detalle la morfología de los plerocercoides encontrados en estos delfines, y se solicitó a diversos museos aquéllos que no estaban descritos en la bibliografía para su examen. El análisis mostró que, independientemente de la especie hospedadora y de la localidad geográfica, existen dos tipos básicos de plerocercoides tetrafilídeos en los mamíferos marinos analizados hasta la fecha. Ambos poseen una morfología similar (cuerpo con forma lanceolada y escólex con una ventosa apical y 4 botridios monoloculares con ventosa accesoria), pero se distinguen fácilmente por el tamaño, por lo que los denominamos como ‘pequeño’ y ‘grande’. Las variables morfométricas que mejor separan ambos tipos son la longitud total de la larva y la anchura del botridio.

La morfología de los individuos de *P. delphini* y *M. grimaldii* encontrados en nuestra muestra concuerda con las descripciones previas de estos merocercoides en otros hospedadores y otras localidades geográficas, excepto en la estructura del órgano apical. La variabilidad observada

en este órgano, tanto entre los ejemplares de nuestra muestra como en las descripciones de la literatura, sugiere que el órgano apical va degenerando en el merocercoides y terminaría desapareciendo en el adulto. Por otra parte, hallamos por primera vez 9 ejemplares de *P. delphini* mostrando un inicio de proglotización; en los proglótides más desarrollados se observaron incluso esbozos de los órganos genitales. El escólex de estos merocercoides era muy similar al de los individuos sin proglótides del mismo individuo hospedador, aunque las estructuras del escólex fueron algo mayores en los especímenes proglotizados.

Por otra parte, analizamos por primera vez el tegumento de *P. delphini*, *M. grimaldii* y los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’. El tegumento se encuentra totalmente recubierto por microtricos, de 4 tipos básicos: filitricos, espinitricos lanceolados, y dos tipos nuevos, espinitricos cónicos con dos proyecciones paralelas y pequeñas en la punta, y espinitricos cilíndricos coronados por 6-7 pequeñas papilas. La morfología y patrón de distribución de los microtricos en los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’ es relativamente similar a los de otros plerocercoides de tetrafilídeos descritos en la literatura: el cuerpo y el escólex está recubierto por espinitricos lanceolados de diferentes tamaños, excepto en la ventosa apical, donde sólo se encuentran filitricos. Sin embargo, los merocercoides exhiben una mayor variedad de microtricos, ya que presentan filitricos y espinitricos lanceolados en distintas regiones del escólex y en el filamento de invaginación, y espinitricos cónicos (*M. grimaldii*) o espinitricos cilíndricos coronados (*P. delphini*) en el botridio distal. Además de los microtricos se observan estructuras ciliares en toda la superficie adherente o distal del botridio, incluida la ventosa accesoria, de los 4 tipos larvarios, y en la ventosa apical de los plerocercoides. Los cilios están rodeados por multitud de filitricos en el caso de los merocercoides. Generalmente, a las estructuras ciliares se les atribuye una función sensorial.

Para el análisis molecular de *P. delphini*, *M. grimaldii* y los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’ se secuenció la región variable D2 (~650 pb) del gen nuclear 1srDNA (LSU). Hallamos 4 únicas secuencias diagnósticas (‘signatures’) LSU que correspondieron con los 4 tipos morfológicos, independientemente de la especie hospedadora y el microhábitat dentro del hospedador. La inclusión de estas secuencias en un árbol filogenético parcial del orden Tetraphyllidea mostró que los 4 tipos de larvas forman un grupo monofilético junto con *Clistobothrium montaukensis*. Las pequeñas distancias genéticas observadas entre estos taxones parecen indicar que se trata de especies diferentes pero congenéricas, aunque en el caso del plerocercoides ‘pequeño’ y *M. grimaldii* estas distancias son aún menores (sólo 1 pb), lo que sugiere diferencias intraespecíficas. De acuerdo con estos resultados: (1) Cada tipo de merocercoides representa una especie única, a pesar de que se observaron ciertas variaciones morfológicas; este resultado cuestiona sugerencias previas de que la variabilidad morfológica en estas larvas podría reflejar diferencias interespecíficas. (2) El plerocercoides ‘pequeño’ no es el estado de desarrollo

previo del ‘grande’, contrariamente a lo que algunos autores habían sugerido. (3) El plerocercóide ‘grande’ no es el estado de desarrollo previo ni de *P. delphini* ni de *M. grimaldii*, contrariamente a lo que se había sugerido. (4) El plerocercóide ‘pequeño’ podría ser la fase anterior de desarrollo de *M. grimaldii*, pero no se sabe si podría serlo también de *P. delphini*. Por otro lado, el análisis filogenético indica que *P. delphini* se encuentra muy separado de *Phyllobothrium lactuca*, la especie tipo del género *Phyllobothrium*.

Diversos autores han demostrado que la morfología y distribución de los microtricos del escólex de cestodos adultos sirve para diferenciar especies. Nuestro estudio muestra que la divergencia morfológica y molecular entre *P. delphini* y *M. grimaldii* está asociada a diferencias en la morfología de los microtricos ya en el estado larvario. Sin embargo, los microtricos de los plerocercóides analizados hasta la fecha (incluidos los del presente trabajo) presentan una morfología bastante homogénea independientemente de la especie, por lo que carecerían de valor diagnóstico en este estado de desarrollo.

En los delfines listados, delfines mulares y calderones grises analizados en el presente trabajo los 4 tipos larvarios se encontraron con una prevalencia e intensidad de parasitación de moderada a alta. Además, cada tipo larvario tendió a aparecer de forma predecible en microhábitats específicos dentro de cada delfín, independientemente de la especie hospedadora: *P. delphini* en la grasa subcutánea; *M. grimaldii* en el peritoneo y mesenterios de la cavidad abdominal (en ambas larvas, la mayor concentración de individuos apareció en la región ano-genital); los plerocercóides ‘grandes’ y ‘pequeños’ en el lumen de las cámaras estomacales y el intestino, aunque los ‘grandes’ tendían a acumularse dentro de las criptas anales y los conductos hepáticos y pancreáticos (excepto en esta última localización en los delfines mulares) y, los ‘pequeños’, dentro de la mucosa del estómago pilórico y el colon terminal y recto. En estos últimos microhábitats existen nódulos linfáticos bastante desarrollados, por lo que los plerocercóides ‘pequeños’ podrían utilizar el sistema linfático para alcanzar el peritoneo y mesenterios (y quizá la grasa) para transformarse en el estado merocercóide.

Por otra parte, una revisión bibliográfica exhaustiva reveló la existencia de dos grandes patrones de infección de larvas de tetrafilídeos en cetáceos y pinnípedos de todo el mundo. Las larvas infectan normalmente mamíferos marinos que tienen hábitos pelágicos y que se alimentan preferentemente de peces y/o cefalópodos.

En conjunto, los datos morfológicos, moleculares y ecológicos sugieren que los mamíferos marinos actúan como hospedadores intermediarios para *P. delphini* y *M. grimaldii*, y al menos como hospedadores paraténicos para el plerocercóide ‘grande’. Esta hipótesis se basa en las

siguientes evidencias: (1) los merocercoides presentan una estructura quística especializada, por lo que debe producirse un cambio ontogenético dentro del hospedador mamífero; (2) el análisis molecular muestra que todos los tipos larvarios están estrechamente relacionados con *C. montaukensis*, parásito de grandes tiburones pelágicos de la familia Lamnidae, que suelen alimentarse de mamíferos marinos; (3) estas larvas infectan habitualmente cetáceos y pinnípedos pelágicos; (4) tanto los merocercoides como los plerocercoides se hallaron en las especies de cetáceos analizadas con prevalencias e intensidades de parasitación de moderadas a altas, apareciendo en microhábitats predecibles dentro del cuerpo del hospedador.

Desde un punto de vista evolutivo, postulamos que los mamíferos marinos comenzaron a formar parte del ciclo vital de algunos tetrafilídeos a través de un proceso de ‘incorporación inferior’ justo antes del hospedador definitivo. Partiendo de un ciclo original que probablemente incluía invertebrados, teleósteos y tiburones, algunos tetrafilídeos obtendrían ventajas al infectar los mamíferos que, al colonizar el medio oceánico, comenzaron a alimentarse de invertebrados y teleósteos marinos, y a su vez, se convirtieron en presas de algunos tiburones. Las ventajas principales serían las siguientes: (1) los mamíferos marinos actuarían como grandes acumuladores de los 3 tipos larvarios, por lo que la probabilidad de transmisión al hospedador definitivo se incrementaría sustancialmente; (2) el reclutamiento de muchas larvas en un mismo hospedador individual supondría que todas ellas alcanzarían el mismo hospedador definitivo, aumentando así la posibilidad de encontrar pareja reproductora y favoreciendo la mezcla de genotipos larvarios; (3) la elevada longevidad y tamaño del nuevo hospedador intermediario mamífero permitiría que las larvas alcanzaran un grado de desarrollo mayor, pudiendo comenzar a reproducirse rápidamente al llegar al hospedador definitivo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Toni Raga y Javi Aznar, ya que sin vosotros este trabajo no habría sido posible. Gracias por el apoyo científico y moral, por creer en mí, por alentarme en los momentos difíciles de este largo y duro camino, en suma, por enseñarme a investigar.

A continuación, quiero expresar mi más sincera gratitud a mi familia, mis padres, mi hermano, mis abuelos, y como no, a Kira y Trueno, que también forman parte de mi familia ('en todas sus dimensiones'...), ya que sin vosotros este trabajo no se habría acabado nunca. Gracias por apoyarme en todo momento, por ayudarme a desconectar, por aguantar mi cansancio, mi mal humor y mis momentos bajos. Gracias sinceramente por vuestra paciencia y comprensión. Quiero recordar también a mi tía Misericordia. Ella ha sido una de las guías que me han conducido hasta este momento, ya que desde mi infancia intuyó en mí a una futura investigadora, cultivando siempre que pudo esa semilla. Gracias también al resto de mi familia de Reus, por animarme a continuar en la brecha.

Gracias a todos mis compañeros y compañeras de laboratorio (y por suerte amigos y amigas): a Paco, Vicky, Merche, Javi B, Noemí, Jesús, Merche 3, Amaia, Euge, Diana, Patricia, Isa, Ana Pérez, David, Astrid, Carlos ('canario'), Tamara, Juanito, Aigües, Barbie, Ana Ahuir, Lucas, M^a José, Gemma, Neus y a un montón de gente más que han compartido conmigo este camino. Gracias por vuestra ayuda con las sangrientas y muchas veces olorosas necropsias y análisis de vísceras, gracias por vuestros comentarios y charlas científicas, gracias por vuestro aliento y apoyo, gracias por estar ahí siempre que os he necesitado.

Gracias, Aneta, por ser mi 'mami parasitóloga'. Gracias porque sin tu ayuda y apoyo no sé si estaría ahora escribiendo estas líneas. Gracias por creer en mí y en mi trabajo. Gracias por ese empujón que fue fundamental para que esta tesis saliera adelante. Y por supuesto, mi más sincero agradecimiento a Peter Olson, por su trabajo en el apartado molecular. Gracias por tu paciencia y tu buen hacer, sin lugar a dudas este estudio no habría sido posible sin tu aportación. También quiero agradecer profundamente a Ana Resendes, Juan Antonio Balbuena, Carmen Blanco, Ángeles Raduán, Enrique Carbonell, Tim Littlewood, Manolo Carrascosa, Vicente Roca, Pepe Pertusa, Jose Manuel García Verdugo, Mario Soriano, Al Bush y Maggie, Mariano Domingo y otros muchos profesores e investigadores que me habéis enseñado, ayudado y apoyado a lo largo de este tiempo. Gracias también a todo el equipo del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valencia, ya que me habéis ayudado en todo momento y habéis contribuido a mejorar

sustancialmente la calidad de las imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido.

Gracias, como no, a Jose Rafa, ya que has compartido conmigo parte de este tiempo y trabajo. Gracias por tu apoyo y comprensión en todo momento y lugar (hasta en Canadá!). Gracias por enseñarme tantas cosas de la investigación, de Biología Marina, del mar, de la montaña, de la vida en general. También quiero agradecerle a tu familia su apoyo incondicional.

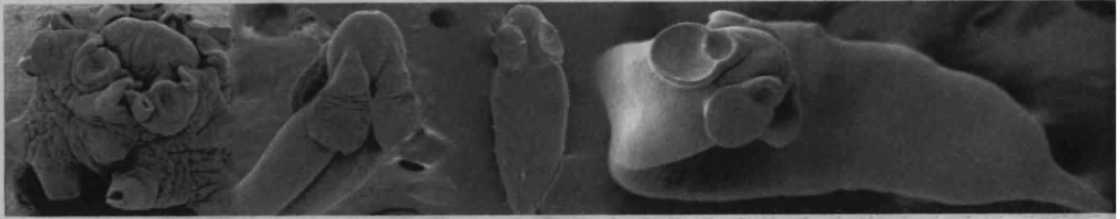
Gracias también a Juanjo, por tu paciencia, comprensión y ayuda, que han sido fundamentales en estos últimos años. Gracias por enseñarme a ver la vida de otra manera.

Y por supuesto, a Eliseo y Patricia! que me habéis ayudado a recuperarme física y psíquicamente en los peores momentos. Gracias por vuestras manos y vuestro trabajo bien hecho.

Por último, quiero agradecer a todos mis amigos y amigas, y a todos los que han compartido conmigo estos años de mi vida en otros trabajos y proyectos, en especial a Carmina, Ague, M^a Ángeles, Patricia, Bea, Laura, Loli, Dawn, Carol, Pilar, Mónica y Paco, Delia, Ana Resendes, Oscar Cabezón, Jennifer, Paola, Vicent Ramiro, Javi Martínez, Vicente Ferris, Jose Manuel, Noemí y Joan, Vicent Primo, Sarai, M^a José, Núria, David, Raúl, Nati, Tomaso, Jorge, Justo, Hugo, Pili, Isa, Maite, Eva, Susana, Cristóbal, Iñaki, Sergio y a otros muchos que habéis tenido la gran paciencia de continuar siendo mis amigos/as durante estos duros años.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de los diferentes estados de desarrollo de los tetrafilídeos	5
1.2. Las larvas de tetrafilídeos en los mamíferos marinos	7
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS GLOBALES	15
3.1. Obtención y procesamiento de las muestras	15
3.2. Sinopsis biológica de los hospedadores	16
4. ARTÍCULOS INCLUIDOS	21
4.1. Tetraphyllidean plerocercoids from Western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: A comprehensive morphological analysis	23
4.2. Morphological and molecular characterization of tetraphyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (<i>Stenella coeruleoalba</i>) from the Western Mediterranean	35
4.3. Microtriches of tetraphyllidean metacestodes from Western Mediterranean striped dolphins (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	51
4.4. Insight into the role of cetaceans in the life cycle of the tetraphyllideans (Platyhelminthes: Cestoda)	67
5. RESULTADOS GLOBALES Y DISCUSIÓN	101
5.1. Caracterización de los morfotipos básicos	101
5.2. Caracterización molecular de los cuatro morfotipos larvarios	107
5.3. Papel de los cetáceos en el ciclo vital de las larvas tetrafilídeas	111
6. CONCLUSIONES	121
7. APÉNDICE 1. ¿Una pieza más en el rompecabezas del ciclo vital de los tetrafilídeos?	125
8. APÉNDICE 2. Líneas futuras de investigación	139
9. REFERENCIAS	143

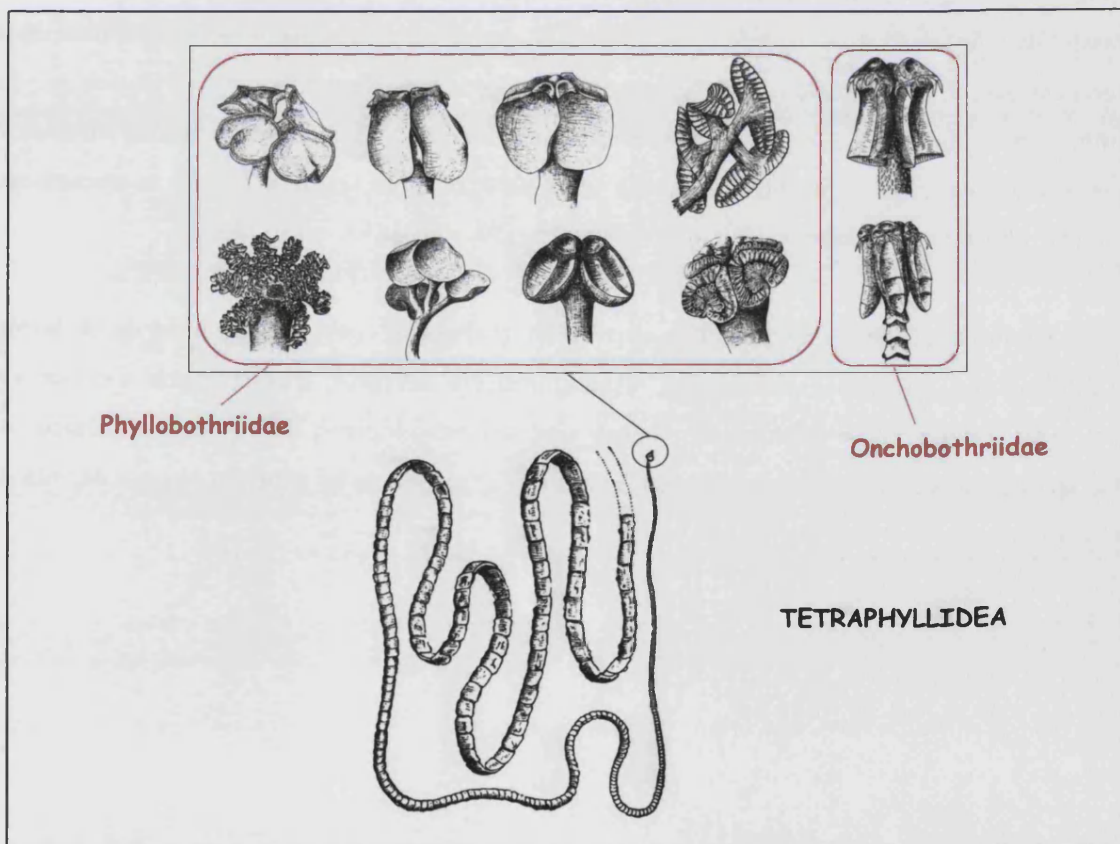


INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al orden **Tetraphyllidea** Carus, 1863 (filo Platyhelminthes, clase Cestoda, subclase Eucestoda) son un grupo de cestodos fundamentalmente marinos. El adulto parasita la válvula espiral (o intestino espiral), y ocasionalmente el estómago, de peces cartilaginosos. De hecho, especies de todos los órdenes de elasmobranquios (tiburones y rayas), albergan una o varias especies de tetrafilídeos; dos especies son propias de holocefálidos (quimeras) (Caira y Reyda, 2005). Actualmente el Orden Tetraphyllidea está formado por 8 familias (Euzet, 1994), aunque la mayoría de géneros se concentran en dos: Phyllobothriidae Braun, 1900, que se caracteriza por poseer cuatro botridios sin ganchos y con formas muy variadas, y Onchobothriidae Braun, 1900, que posee ganchos en los botridios (Figura 1). Hasta la fecha se han descrito unas 540 especies de cestodos tetrafilídeos, el 95% de las cuales aparecen en hábitats marinos y el otro 5% parasitan rayas de agua dulce en ríos de Sudamérica (Caira y Reyda, 2005).

Figura 1. Diversidad de escólices que pueden presentar diferentes especies de tetrafilídeos (dibujos extraídos de Euzet, 1959).



En general, los **ciclos vitales** de los cestodos marinos son poco conocidos, pero se sabe que los tetrafilídeos tienen un ciclo de vida complejo, es decir, requiere de varios hospedadores para ser completado, siendo la transmisión de un hospedador a otro a través de las redes tróficas (Euzet, 1959). Sin embargo, los datos son fragmentarios y no se ha descrito ningún ciclo de vida completo hasta la fecha para ninguna especie de este orden (Caira y Reyda, 2005). Los datos existentes sugieren que su ciclo de vida básico involucraría 3 hospedadores (2 intermediarios y uno definitivo), pero pueden haber hasta 5 si se dan fenómenos de paraténisis. El ciclo vital típico de un tetrafilídeo se desarrollaría de la siguiente forma (Figura 2) (Euzet, 1959; Stunkard, 1977; Caira y Reyda, 2005): el adulto, encargado de la reproducción, vive en el interior de la válvula espiral de peces cartilaginosos (hospedador definitivo); el huevo, provisto de un embrión hexacanto, es liberado al medio marino a través de las heces del hospedador definitivo, pero no eclosiona; el embrión hexacanto permanece dentro del huevo esperando ser consumido por un primer hospedador intermediario apropiado (Tabla 2); cuando esto ocurre, el embrión hexacanto se transforma en procercoide, que es la primera fase larvaria; cuando el primer hospedador intermediario es consumido por un segundo hospedador intermediario, el procercoide se desarrolla hasta la siguiente fase larvaria, el plerocercario/merocercario; esta última fase ya es infectiva para el hospedador definitivo, aunque puede pasar por varios hospedadores paraténicos que incrementan la probabilidad de transmisión al definitivo. El número de hospedadores paraténicos dependerá de la diferencia en el nivel trófico entre el segundo hospedador intermediario y el definitivo. La terminología empleada en el presente trabajo para denominar los diferentes estados larvarios o metacestodos sigue las recomendaciones de Chervy (2002) (Tabla 1). En la Tabla 2 se muestra una lista de los hospedadores que pueden intervenir en el ciclo vital de los tetrafilídeos.

Como se explica a continuación, el **presente trabajo** se centra en el estudio de las **larvas** tetrafilídeas que parasitan habitualmente a los **mamíferos marinos**, concretamente a cetáceos y pinnípedos (Figura 2). Se desconocen muchos aspectos morfológicos, biológicos y ecológicos de estas larvas, entre ellos, si los mamíferos marinos tienen realmente un papel en el ciclo de vida de estos cestodos.

Figura 2. Ciclo vital típico de un cestodo tetrafilideo. Abreviaturas: HD, hospedador definitivo; HI, hospedador intermediario; HP, hospedador paraténico.

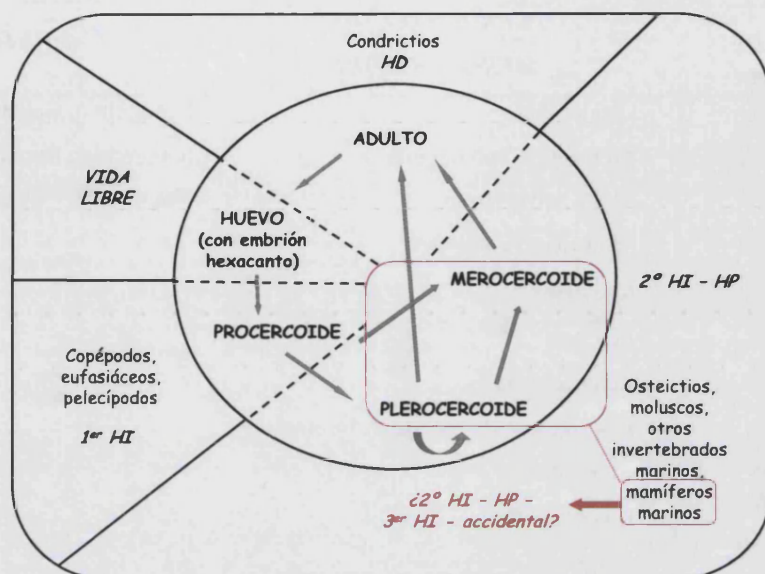


Tabla 1. Nomenclatura utilizada para denominar los diferentes tipos de larvas o metacestodos de los tetrafilídeos y tipo de hospedador que parasitan.

Tipo de larva	Descripción	Hospedador
<i>Procercoide</i>	Metacestodo sin escólex ni 'laguna primaria' [†] , normalmente caudado, no continúa su desarrollo hasta ser ingerido por el segundo hospedador intermediario.	Primer hospedador intermediario
<i>Plerocercóide</i>	Metacestodo con escólex desarrollado (al menos parcialmente), escólex evaginado [‡] , no lagunado, infeccioso para el hospedador definitivo. Ej.: <i>Scolex polymorphus</i> , <i>S. pleuronectis</i>	Segundo hospedador intermediario y/o paraténico
<i>Merocercóide</i>	Metacestodo sin 'laguna primaria', escólex invaginado [‡] , normalmente sin vesícula, excepto en <i>Phyllobothrium delphini</i> , <i>Monorygma grimaldii</i> , <i>Rhodobothrium</i> spp, <i>Rhinebothrium</i> spp y <i>Anthobothrium</i> spp.	Segundo hospedador intermediario y/o paraténico

† ‘Laguna primaria’ (*primary lacuna*): cavidad en el centro del cuerpo de la larva de ciertos taxones de cestodos (Anoplocephalinae, Dilepididae, Hymenolepididae, Taeniidae, etc.) que se desarrolla en estados tempranos de la morfogénesis. Aparece en las larvas de cestodo del tipo cisticercoide y cisticerco (Chervy, 2002).

‡ Observaciones propias así como la de otros autores (Threlfall, 1970; Skrjabin, 1972) sugieren que los plerocercoides tienen la capacidad de invaginar y evaginar el escólex con facilidad, probablemente para protegerlo frente a cambios de las condiciones ambientales, aunque la mayoría de las veces el escólex es externo. Sin embargo, el escólex del merocercoides se encuentra habitualmente invaginado (al final de un canal de invaginación en *P. delphini* y *M. grimaldii*), y es probable que lo evagine sólo al llegar al hospedador definitivo.

Tabla 2. Lista de los hospedadores que pueden intervenir en el ciclo vital de los tetrafilídeos y estados de desarrollo que se encuentran en cada tipo de hospedador.

Primer hospedador intermediario	Segundo hospedador intermediario / hospedador paraténico	Hospedador definitivo
<i>PROCERCOIDE</i>	<i>PLEROCERCOIDE/ MERCERCOIDE</i>	<i>ADULTO</i>
Arthropoda: Copepoda	Osteichthia	Chondrichtia: Galea
Arthropoda: Euphausiacea	Mollusca: Cephalopoda	Chondrichtia: Batoidea
Mollusca: Pelecypoda	Mollusca: Gastropoda	Chondrichtia: Chimaeriformes
	Mollusca: Pelecypoda	
	Nemertea	
	Echiura	
	Echinodermata	
	Arthropoda: Brachyura y Anomura	
	Ctenophora	
	Chaetognatha	
	Cetacea	
	Carnivora: Pinnipedia	

Referencias: Euzet, 1959; Bester, 1989; Raga, 1994; Caira y Reyda, 2005.

1.1. GENERALIDADES DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO DE LOS TETRAFILÍDEOS

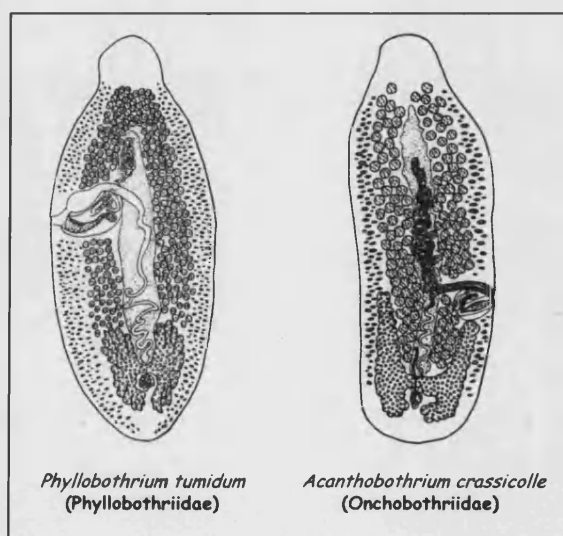
1.1.1. EL ADULTO

Como es habitual en los eucestodos, los adultos de los tetrafilídeos se caracterizan por poseer un órgano anterior de fijación, el escólex, y un cuerpo acintado, llamado estróbilo, que está subdividido en una serie linear de segmentos o proglótides, cada uno de los cuales posee un conjunto de órganos reproductores. La longitud de las formas adultas de los tetrafilídeos varía aproximadamente entre 1 mm y 1 m (Caira y Reyda, 2005). Las especies de este orden se caracterizan por presentar una gran variedad de formas de escólices y botridios (Figura 1) frente a una uniformidad morfológica de los órganos reproductores, lo que favorece que la identificación de las familias, e incluso de géneros, se realice a través de los caracteres del escólex. De hecho, es casi imposible distinguir especies o incluso géneros si el scolex se ha perdido (Wardle y McLeod, 1952).

El escólex lleva 4 botridios musculares cuya forma varía enormemente entre géneros. Respecto al sistema reproductor, los testículos son numerosos y el cirro está habitualmente armado con ganchos, microtricos o espinas. El ovario se encuentra en posición posterior dentro del proglótide, es bilobulado y cada lóbulo está a su vez subdividido horizontalmente, de forma que en sección transversal el ovario tiene forma de X. La vagina es anterior a la bolsa del cirro y cruza el vaso deferente. El poro genital se sitúa en posición lateral, alternando irregularmente de un segmento a otro. Las glándulas vitelógenas están normalmente dispuestas en dos bandas laterales. El útero es medioventral (Figure 3) (Wardle y McLeod, 1952; Euzet, 1959; Smyth, 1994).

La mayoría de especies pertenecientes a este orden son oioxenas, es decir, parasitan sólo a una especie de hospedador definitivo (Caira y Reyda, 2005).

Figura 3. Morfología de los proglótides de dos especies de tetrafilídeos (dibujos extraídos de Euzet, 1959).



1.1.2. LAS FORMAS LARVIARIAS

Procercoide:

Los estudios del desarrollo temprano de los tetrafilídeos son escasos (Caira y Reyda, 2005), pero parecen indicar que el procercoide no tiene 'laguna primaria' y se desarrolla en el primer hospedador intermediario (Tabla 1).

Los estudios existentes hasta la fecha en esta materia (Riser, 1956; Euzet, 1959; Mudry y Dailey, 1971; Jarecka y Burt, 1984) indican que la morfología del procercoide de diferentes especies de tetrafilídeos difiere en la presencia/ausencia del cercómero y del órgano apical, que tiene forma de ventosa. Estas diferencias pueden ser interespecíficas o debidas a distintos grados de desarrollo del procercoide.

Para los tetrafilídeos del Mediterráneo, Euzet (1959) realizó infecciones experimentales de diversos invertebrados con huevos de varias especies de tetrafilídeos. Obtuvo resultados positivos al infectar copépodos planctónicos del género *Acartia* con huevos embrionados de *Phyllobothrium lactuca* que había obtenido de la musola, *Mustelus canis*. Obtuvo procercoides de 6-8 días de desarrollo en los que observó una diferenciación de la parte anterior de la posterior, pero estas larvas no poseían ventosa apical ni cercómero.

Plerocercóide:

Se han encontrado plerocercóides tetrafilídeos en multitud de animales marinos de todo el mundo. Su morfología general es similar: el cuerpo es lanceolado y el escólex posee una ventosa apical, y cuatro botridios de distintas morfologías. La mayoría de estas larvas están poco diferenciadas y no poseen la riqueza de caracteres morfológicos del adulto. Por esta razón, la gran mayoría de plerocercóides de tetrafilídeos halladas en animales marinos no se han identificado a nivel de especie. De hecho, se han empleado de forma genérica los términos *Scolex pleuronectis* y *S. polymorphus* para denominar a gran parte de estos plerocercóides. Diversos autores han clasificado estas larvas según la morfología del escólex y han intentado una asignación taxonómica más fina, al menos a nivel de familia e incluso de género, para algunas de ellas (Stunkard, 1977; Avdeeva y Avdeev, 1989; Wojciechowska, 1993; Chambers *et al.*, 2000).

En ocasiones se ha utilizado el término post-plerocercóide o post-larva para denominar larvas que presentaban un principio de segmentación o proglotización (Caira y Reyda, 2005). Además, el escólex suele estar bastante desarrollado. En los tetrafilídeos, este fenómeno se ha observado en algunas larvas de filobótridos que infectan cefalópodos y/o peces teleósteos depredadores (Euzet, 1959).

Merocercóide:

Entre los tetrafilídeos sólo se han descrito hasta la fecha larvas del tipo merocercóide en cinco géneros: *Phyllobothrium delphini*, *Monorygma grimaldii*, *Rhodobothrium* spp, *Rhinebothrium* spp y *Anthobothrium* spp. Todos ellos poseen una vesícula donde se invagina el escólex, y éste suele estar bastante desarrollado (de forma similar a como ocurre en los post-plerocercóides).

1.2. LAS LARVAS DE TETRAFILÍDEOS EN LOS MAMÍFEROS MARINOS

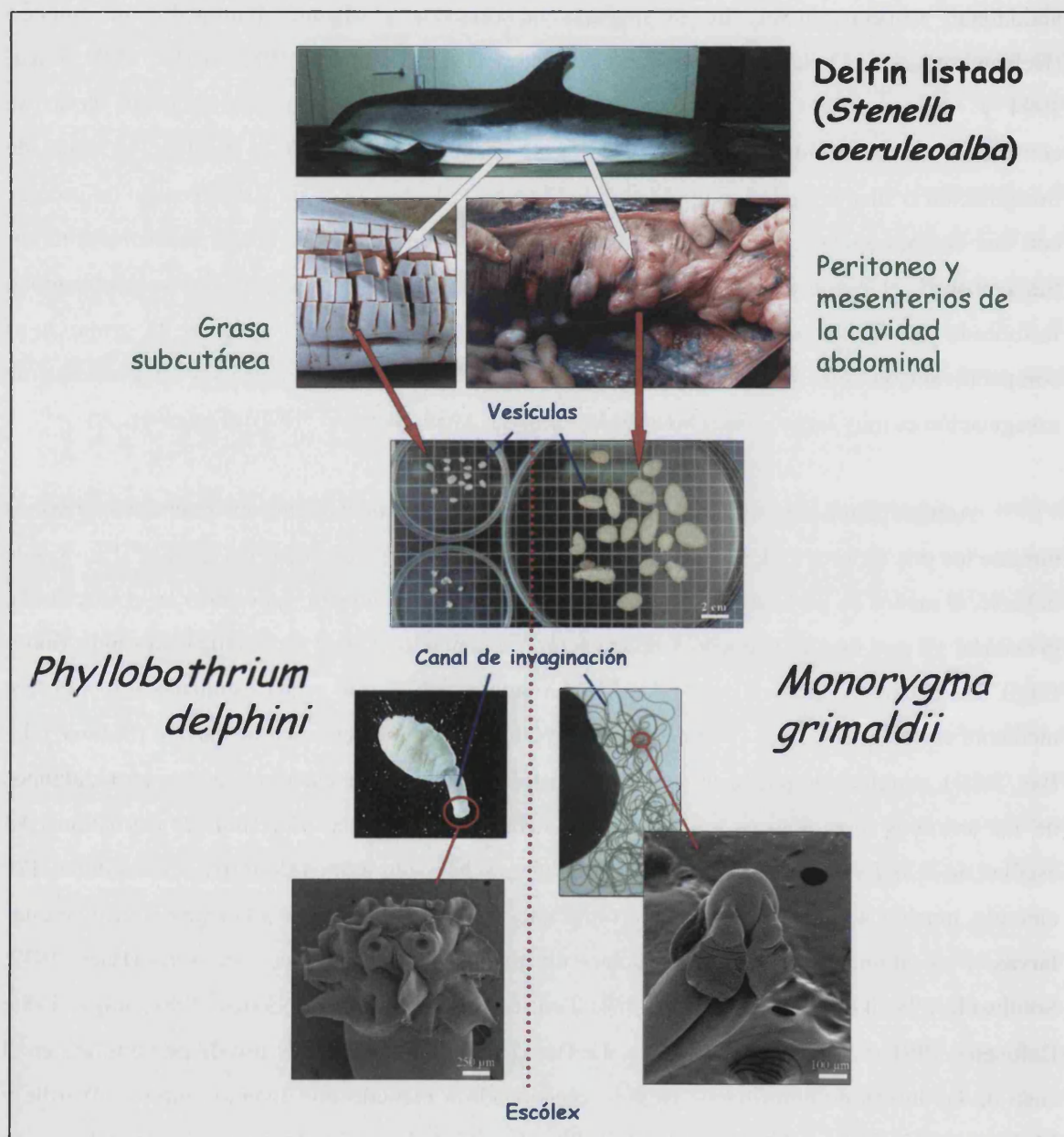
1.2.1. ANTECEDENTES

Las larvas de cestodos tetrafilídeos más frecuentemente citadas en mamíferos marinos son *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) van Beneden, 1868 y *Monorygma grimaldii* (Moniez, 1889) Baylis, 1919, que se encuentran enquistadas en la grasa subcutánea y peritoneo de la cavidad abdominal, respectivamente, de la mayoría de cetáceos y algunos pinnípedos del mundo (Delyamure, 1955; Dailey y Brownell, 1972; Dailey, 1985; Lauckner, 1985; Bester, 1989; Raga, 1994 y referencias del trabajo; Gibson et al., 1998; Colom-Llavina, 2005). Estas larvas se consideran merocercoides, ya que el escólex se encuentra invaginado al final de un canal de invaginación o filamento de longitud variable (Tabla 1). Ambos tipos de larvas poseen un escólex con una ventosa apical y 4 botridios monoloculares, cada uno con una ventosa accesoria anterior. Sin embargo, el escólex de *P. delphini* es grande, el margen de los botridios está plegado o festoneado y el filamento o canal de invaginación es corto y grueso. El escólex de *M. grimaldii* es comparativamente más pequeño, los botridios tienen bordes simples o lisos y el filamento de invaginación es muy largo y fino (Southwell y Walker, 1936; Skrjabin, 1970) (Figura 4).

Aunque estos dos tipos de larvas se han citado frecuentemente en mamíferos marinos durante los dos últimos siglos, existen muy pocas descripciones detalladas del escólex. Esto puede deberse, al menos en parte, a la dificultad en obtener el escólex intacto, sobre todo en el caso de *M. grimaldii*, ya que éste es pequeño y se encuentra invaginado al final de un filamento muy fino y frágil. De hecho, el escólex de *P. delphini* ha sido el único que se ha estudiado someramente mediante cortes histológicos (Mendonça, 1984) y microscopía electrónica de barrido (Siquier y Le Bas, 2003), aunque sólo puede apreciarse la morfología general del escólex. Por otra parte, algunos de los términos morfológicos empleados por diversos autores para describir las estructuras del escólex de *P. delphini* y *M. grimaldii* son ambiguos y han sido usados de forma inconsistente. Por ejemplo, muchos autores han usado el término ‘mizorrinco’ para referirse a la región apical de estas larvas, y en algunos casos, a la estructura apical que se encuentra en esta zona (Baer, 1932; Southwell y Walker, 1936; Dollfus, 1964; Testa y Dailey, 1977; Mendonça, 1984; Raga, 1985; Balbuena, 1991; Soulier, 1993; Siquier y Le Bas, 2003). Sin embargo, el uso de este término en el caso de las larvas de tetrafilídeos ha sido cuestionado a menudo por diversos autores (Wardle y McLeod, 1952; Euzet, 1959; Caira et al., 1999). Por otro lado, en las descripciones de ambos tipos de merocercoides que encontramos en la bibliografía, el órgano apical, bien no se menciona (Linton, 1905; Baer, 1932; Guiart, 1935; Garippa et al., 1991) o, más comúnmente, se describe como una ventosa apical (Southwell y Walker, 1936; Delyamure, 1955; Dollfus, 1964; Skrjabin, 1964; Skrjabin, 1970, 1972; Testa y Dailey, 1977; Mendonça, 1984; Raga, 1985; Balbuena, 1991; Siquier y Le Bas, 2003). En especímenes de *P. delphini*, Johnston y Mawson (1939) describieron

este órgano como un tapón o botón apical. La variabilidad encontrada en las descripciones previas de las estructuras del escólex puede ser real o bien deberse a la falta de estudios morfológicos detallados.

Figura 4. Los merocercoides, *Phyllobothrium delphini* y *Monorygma grimaldii*, en el delfín listado del Mediterráneo occidental: localización en el hospedador y morfología general.



Además de las formas quísticas, en la bibliografía se han citado, de forma más ocasional, otros tipos de larvas tetrafilídeas que aparecen en el tracto digestivo y conductos hepatopancreáticos de algunos mamíferos marinos. De acuerdo con las escasas descripciones disponibles estas larvas son del tipo **plerocercoides** (Tabla 1) y parecen existir dos tipos diferenciados por la morfología del botridio: el morfotipo I, que posee un escólex con una ventosa apical y 4 botridios biloculares sin ventosa accesoria (Skrjabin, 1972; Skrjabin y Yurakhno, 1987), y el morfotipo II, con un escólex con una ventosa apical y 4 botridios monoloculares con una ventosa accesoria anterior (Stossich, 1898; Skrjabin, 1972). En la Tabla 1 del capítulo 4.1 se encuentra un resumen de las citas disponibles de estas larvas.

Respecto a la **identidad específica** del conjunto de larvas tetrafilídeas que suelen parasitar a los **mamíferos marinos** y al **papel** de estos hospedadores en su ciclo vital, no se ha realizado ningún estudio experimental hasta la fecha, pero se han sugerido diversas hipótesis:

La mayoría de los autores piensan que *P. delphini* y *M. grimaldii* usan los cetáceos, y más raramente los pinnípedos, como hospedadores intermediarios para infectar a los definitivos, probablemente grandes tiburones pelágicos; sin embargo, la identidad específica de estas larvas es aún desconocida (Testa y Dailey, 1977; Walker, 2001; Siquier y Le Bas, 2003). De hecho, los términos *Phyllobothrium delphini* y *Monorygma grimaldii* se han usado históricamente como nombres para reconocer y diferenciar los dos tipos de merocercoides comúnmente encontrados en mamíferos marinos. Sin embargo, la validez taxonómica de estos nombres es cuestionable, ya que ni *P. delphini* ni *M. grimaldii* concuerdan con el diagnóstico actual de sus supuestos géneros (ver Ruhnke, 1996 y Euzet, 1994, respectivamente). Además, algunos autores han reconocido diferentes morfotipos de *P. delphini* (Guiart, 1935; Delyamure, 1955; Testa y Dailey, 1977). Dailey (1985) sugirió que estos morfotipos podrían representar diferentes especies, mientras que la uniformidad morfológica de *M. grimaldii* sugeriría que esta larva representa una única especie. Sin embargo, algunos autores consideran que los morfotipos de *P. delphini* correspondan a diferentes estados de desarrollo de la misma especie (Siquier y Le Bas, 2003).

Por otra parte, se desconoce la identidad específica de los plerocercoides hallados en cetáceos y pinnípedos, así como el significado ecológico de estas infecciones. Skrjabin (1972) especuló que los dos tipos de plerocercoides hallados en el digestivo de cachalotes, los morfotipos I y II descritos anteriormente, podían ser estados anteriores de los merocercoides *P. delphini* y *M. grimaldii*, siendo los plerocercoides de tipo I, de tamaño más pequeño, el estado anterior de desarrollo del tipo II, de tamaño mayor. Esta hipótesis se basó en dos observaciones, (1) Skrjabin (1972) encontró plerocercoides horadando la pared del estómago y duodeno de cachalotes, lugares

desde donde podrían entrar en el sistema circulatorio y/o linfático y llegar así a las localizaciones donde los merocercoides aparecen enquistados, y (2) observó formas de *P. delphini*, supuestamente individuos en un estado temprano de desarrollo, con un escólex parecido al de los plerocercoides de tipo II. La hipótesis planteada por Skrjabin (1972) es aceptable, sin embargo, está basada tan sólo en pruebas circunstanciales, como el parecido morfológico del escólex y la presencia de plerocercoides y merocercoides en el mismo hospedador.

1.2.2. PREGUNTAS PLANTEADAS

De la información disponible sobre estas larvas en la literatura se desprende que las descripciones morfológicas son escasas e incompletas y que las hipótesis sugeridas sobre el papel de los mamíferos marinos en su ciclo vital y las posibles relaciones ontogenéticas entre las larvas deben ser testadas. Por tanto, en este trabajo se plantean una serie de preguntas a las que se trata de dar respuesta:

1. ¿Cuántos **morfotipos de cestodos tetrafilídeos** parasitan habitualmente a cetáceos y pinnípedos? ¿Corresponden esos morfotipos a **especies diferentes**?
2. ¿Existe alguna **relación ontogenética** entre los diferentes tipos larvarios?
3. ¿Cuál es su **identidad específica**?
4. ¿Los mamíferos marinos desempeñan un **papel significativo en el ciclo vital** de estas larvas o simplemente las adquieren accidentalmente con las presas?

Para responder a las tres primeras preguntas en primer lugar se debe conocer la **morfología** detallada de todos los tipos larvarios y delimitar morfotipos. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las veces el escólex larvario no está totalmente desarrollado, por lo que la morfología sola muchas veces no es suficiente para su identificación específica. Por tanto, sería necesario realizar estudios de cultivo *in vitro* o infecciones experimentales para conocer cuantas especies existen realmente, si los plerocercoides son el estado anterior de los merocercoides y cual es su forma adulta. Sin embargo, estos métodos no se han podido aplicar con éxito en el caso de los tetrafilídeos debido a las dificultades técnicas para mantener algunos hospedadores en condiciones controladas de laboratorio (Stunkard, 1977), especialmente los grandes tiburones pelágicos o los cetáceos, y a la dificultad de reproducir las condiciones fisiológicas necesarias para el completo desarrollo del parásito (Euzet, 1959; Hamilton y Byram, 1974). Afortunadamente, en los últimos años se está desarrollando una técnica mucho más rápida y efectiva, los marcadores **moleculares**, que permiten asignar las larvas con sus adultos correspondientes (Brickle *et al*, 2001 y referencias del trabajo).

Por otro lado, estudios recientes han mostrado que la morfología y patrón de distribución de las estructuras tegumentales en la mayoría de cestodos adultos y post-larvas analizadas aporta datos valiosos a la hora de diferenciar especies (Caira, 1992; Ruhnke, 1994; Ruhnke, 1996; Tyler y Caira, 1999; Caira y Tracy, 2002). Apenas existen datos sobre estos caracteres en larvas de tetrafilídeos (Gabrion y Euzet-Sicard, 1979; Khalil, 1995; Caira y Ruhnke, 1991), y ninguno en larvas de mamíferos marinos, pero es posible que su estudio ayude a identificar las formas adultas de estas larvas e incluso se puedan realizar inferencias sobre el desarrollo ontogenético de estas estructuras en el desarrollo larvario (Caira y Ruhnke, 1991).

Una vez conocida la identidad específica de las larvas, es relativamente sencillo responder a la cuarta pregunta si se conocen datos precisos sobre la infección de las larvas en los mamíferos marinos, como prevalencia, intensidad de parasitación y selección de hábitat.

2. OBJETIVOS

Los objetivos que se presentan a continuación tratan de dar respuesta a las preguntas formuladas anteriormente:

1. **Caracterizar los morfotipos básicos de larvas tetrafilídeas** que parasitan a los mamíferos marinos, un aspecto especialmente necesario en el caso de los plerocercoides. Para ello se examina en detalle la morfología y morfometría de las larvas halladas en cetáceos del Mediterráneo occidental (delfín listado, delfín mular, calderón gris y zifio de Cuvier) mediante técnicas histológicas y de microscopía electrónica de barrido. Las estructuras que mayores conflictos de interpretación han generado en la literatura, como las estructuras apicales del escólex y la de los botridios, se redesciben y renombran. También se analizan ejemplares citados en la bibliografía en otros mamíferos marinos y otras localidades geográficas (se solicitan diversos plerocercoides no descritos en la bibliografía a diferentes museos para su análisis; capítulo 4.1). Estas cuestiones han sido tratadas y publicadas en los siguientes trabajos de investigación:
 - A. La morfología de los **plerocercoides** se discute en el trabajo publicado en la revista *Journal of Parasitology* (capítulo 4.1).
 - B. La morfología de los **merocercoides**, *P. delphini* y *M. grimaldii*, en el trabajo publicado en la revista *Parasitology* (capítulo 4.2). Además, en este estudio se analizan ejemplares de *P. delphini* que presentan proglótides inmaduros. Esta es la primera vez que se cita y describe un inicio de proglotización en *P. delphini*, permitiendo el estudio de posibles cambios ontogenéticos en estas larvas.
 - C. La morfología y distribución de las **estructuras tegumentales** de plerocercoides y merocercoides se analiza en el estudio publicado en la revista *Journal of Morphology* (capítulo 4.3). El objetivo de este trabajo es analizar la morfología y función de estas estructuras con el fin de elucidar aspectos taxonómicos y ontogenéticos de las larvas.

2. **Caracterizar molecularmente los morfotipos larvarios** que parasitan a los cetáceos del Mediterráneo occidental. Mediante este estudio se intenta averiguar:
 - A. Si cada morfotipo corresponde a una especie diferente.
 - B. Si no es así, averiguar si existe alguna relación ontogenética entre ellas: ¿las formas móviles (plerocercoides) son las formas anteriores de las quísticas (merocercoides)?
 - C. Conocer la identidad específica de las larvas.
3. **Discutir si los cetáceos desempeñan un papel en el ciclo vital de estas larvas.** Para abordar este objetivo, los análisis anteriores se complementan con datos ecológicos de las infecciones en los cetáceos analizados (prevalencia, intensidad de parasitación y selección de hábitat). Se realiza también una exhaustiva revisión bibliográfica con el fin de determinar patrones en las relaciones parásito-hospedador. El conjunto de estos análisis ayuda de determinar si los cetáceos son hospedadores requeridos para el ciclo vital de estas larvas.

Los objetivos 2 y 3 han sido tratados en el trabajo de investigación enviado a la revista *International Journal for Parasitology* para su publicación (capítulo 4.4).



MATERIALES Y MÉTODOS GLOBALES

3. MATERIALES Y MÉTODOS GLOBALES

3.1. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Se analizaron larvas tetrafilídeas en 4 especies de cetáceos del Mediterráneo occidental: 50 delfines listados, 8 calderones grises, 4 delfines mulares y 1 zifio de Cuvier. Esta muestra corresponde a animales varados muertos a lo largo de la costa española levantina desde 1990 hasta 2003. Estos animales estaban en buen estado de conservación (códigos 2-3 según Geraci y Lounsbury, 1993).

Se examinaron los siguientes órganos y tejidos: grasa subcutánea, peritoneo y mesenterios de la cavidad abdominal, pulmones, corazón, las 3 cámaras estomacales, intestino, hígado, páncreas, bazo, riñones, órganos reproductores y vejiga urinaria (el hígado y páncreas del zifio de Cuvier no pudo ser analizado). El intestino fue dividido en 20 secciones iguales, y cada una, así como cada cámara estomacal (estómago mecánico, químico y pilórico), fue examinada por separado. Se recogieron las larvas encontradas en el lumen de cada cámara/sección y se revisaron sus paredes para detectar larvas *in situ*. No siempre fue posible recoger y contar todos los plerocercoides de cada órgano a no ser que el delfín estuviera en muy buenas condiciones y las vísceras se analizaran en fresco. Por ello, se adoptó un índice de intensidad (INI) para todos los tipos larvarios: 1 (entre 1 y 10 larvas); 2 (entre 11 y 100); 3 (entre 101 y 1000), y 4 (más de 1000). Por otro lado, no todos los órganos de cada individuo hospedador pudieron ser analizados respecto a todos los tipos larvarios.

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva con el fin de recopilar todas las citas disponibles de metacestodos en cetáceos y pinnípedos. Además, en el caso de los plerocercoides se solicitaron especímenes depositados en diversos museos para su análisis morfológico detallado. La información obtenida se utilizó tanto para los análisis morfológicos y morfométricos, como para detectar posibles patrones de infección entre las larvas y sus hospedadores.

Para el estudio **morfológico y morfométrico** de las larvas se seleccionó una muestra de las localizaciones donde se encontraron más frecuentemente. Los especímenes se procesaron con diferentes metodologías según la técnica mediante la cual iban a ser analizados. Se usó la microscopía óptica convencional, microscopía electrónica de barrido y técnicas histológicas (ver capítulos 4.1 y 4.2 para más detalles). Además, en tres delfines listados, piezas pequeñas (2 x 1 cm) del estómago pilórico, colon terminal y canal anal se cortaron para examinar larvas *in situ* mediante microscopía óptica. Estas piezas de tejido se fijaron en formol tamponado al 10%, se embebieron en parafina, se cortaron a 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina.



Para el **estudio molecular** se secuenció la región variable D2 (~650 pb) del gen nuclear 1srDNA (LSU) de cada espécimen seleccionado (Tabla 1 del capítulo 4.4), y se comparó con las secuencias LSU publicadas para otros cestodos tetrafilídeos. Se utilizó la parte posterior del cuerpo o la vesícula de la larva para la secuenciación molecular, mientras que el escólex de cada individuo se depositó en The Natural History Museum (Londres) como especímenes representativos (voucher). No se pudo obtener ningún plerocercóide pequeño del estómago pilórico de ningún hospedador para el análisis molecular.

El **análisis ecológico** se realizó a partir de 3 especies hospedadoras, el delfín listado, delfín mular y calderón gris. Las características de las muestras usadas en este estudio pueden verse en la Tabla 1 del capítulo 4.4. Para detectar diferencias en la frecuencia e intensidad de parasitación entre los diferentes microhábitats dentro del hospedador se utilizó exclusivamente los datos obtenidos de las larvas del delfín listado, la única especie hospedadora con un tamaño muestral aceptable (50 delfines). Se analizó la distribución detallada de los plerocercoides a lo largo del intestino sólo en el caso de las larvas grandes, ya que el reducido tamaño de las larvas pequeñas y su localización (dentro de la mucosa) hacía que fueran difíciles de detectar.

3.2. SINOPSIS BIOLÓGICA DE LOS HOSPEDADORES

A continuación se expone una breve sinopsis biológica de las distintas especies de cetáceos analizados en el presente trabajo. Dicha sinopsis se basa en datos obtenidos por nuestro grupo de investigación de las poblaciones mediterráneas de donde provienen los hospedadores analizados en el presente estudio.

DELFIN LISTADO (*Stenella coeruleoalba*)

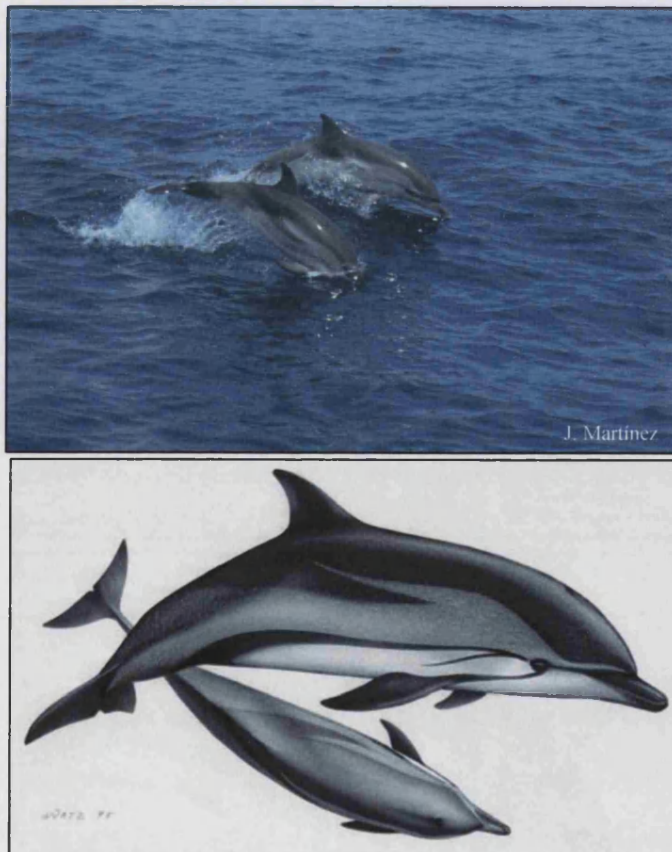
Morfología: Se trata de un delfín de talla pequeña, aproximadamente 2 m de longitud, con un rostro fino y alargado. La coloración corporal es muy característica y está constituida por una serie de líneas negras, grises y blancas en el flanco del animal, a las cuales hace referencia su nombre común.

Biología: Es el delfín más abundante en aguas del levante español; la densidad estimada en el área de estudio durante 2001-2003 fue de 0,489 individuos por km² (Intervalo de confianza del 95%: 0,339-0,705) (Gómez de Segura *et al.*, en prensa). Es un animal gregario que suele vivir en grupos de hasta 400 individuos, aunque el tamaño de grupo más habitual varía entre 15 y 100 individuos. Suele habitar aguas del talud continental, prefiriendo profundidades entre los 800 y 1400 m (Gómez

de Segura *et al.*, 2004). Se alimenta tanto de cefalópodos como de teleósteos de carácter meso y batipelágico (Blanco *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 2005). Los cefalópodos con mayor índice de importancia relativa en la dieta son *Abraliopsis pfefferi*, *Onychoteuthis banksii*, *Todarodes sagittatus* y *Brachioteuthis riisei* (Blanco *et al.*, 1995). La mayor parte de teleósteos corresponden a mictófidios, aunque también consumen merluzas (*Merluccius merluccius*) en menor medida.

Este delfín sufrió una grave epizootia en el mar Mediterráneo durante los años 1990-91 debida a una infección vírica (Aguilar y Raga, 1993). Esta epizootia provocó una gran mortandad y, de hecho, el elevado número de animales disponibles para el presente trabajo se debe en parte a esta mortandad. En la actualidad, la población de delfines listados del Mediterráneo occidental parece haberse recuperado y continua siendo la especie más abundante, lo que se traduce en un número relativamente elevado de varamientos anuales.

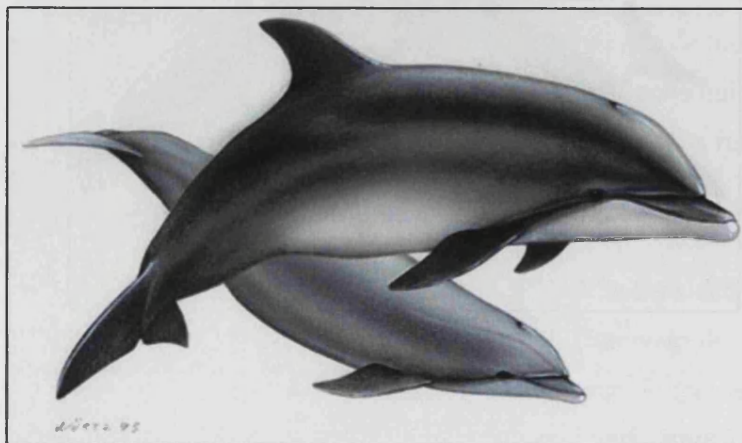
Delfín listado



DELFIN MULAR (*Tursiops truncatus*)

Morfología: Se trata de un delfín de talla media (aproximadamente 3 m de longitud). Posee un rostro más corto y romo que el delfín listado. La coloración corporal es gris, sin líneas definidas, más oscuro en el dorso que en los flancos y con el vientre grisáceo-blanquecino.

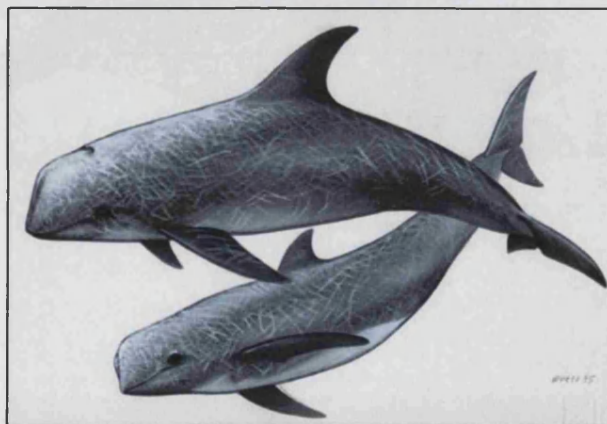
Biología: El delfín mular es bastante menos abundante que el delfín listado; durante 2001-2003 la densidad estimada en aguas del levante español fue de 0,041 individuos por km² (IC 95%: 0,023-0,075) (Gómez de Segura *et al.*, en prensa). Vive en grupos reducidos, de hasta 25 animales, aunque ocasionalmente pueden encontrarse grupos mayores (60 individuos). Se trata de una especie euritópica, aunque preferentemente habita aguas de la plataforma continental y del inicio del talud (hasta los 1000m) (Gómez de Segura *et al.*, 2004). Se alimenta principalmente de teleósteos; la presa más importante en el área de estudio es la merluza. La dieta también incluye, en menor medida, cefalópodos, especialmente octópodos (Blanco *et al.*, 2001). La mayoría de sus presas poseen hábitos demersales y bentónicos en la plataforma continental e inicio del talud.

Delfín mular

CALDERÓN GRIS o DELFÍN DE RISSO (*Grampus griseus*)

Morfología: Se trata de un delfín de talla media (aproximadamente 3 m de longitud). Posee una cabeza redondeada, sin rostro prominente, y una aleta dorsal muy alta. La coloración corporal es muy característica e inconfundible, ya que presenta un fondo gris de tonalidad variable surcado por multitud de líneas blancas e irregulares, a modo de cicatrices.

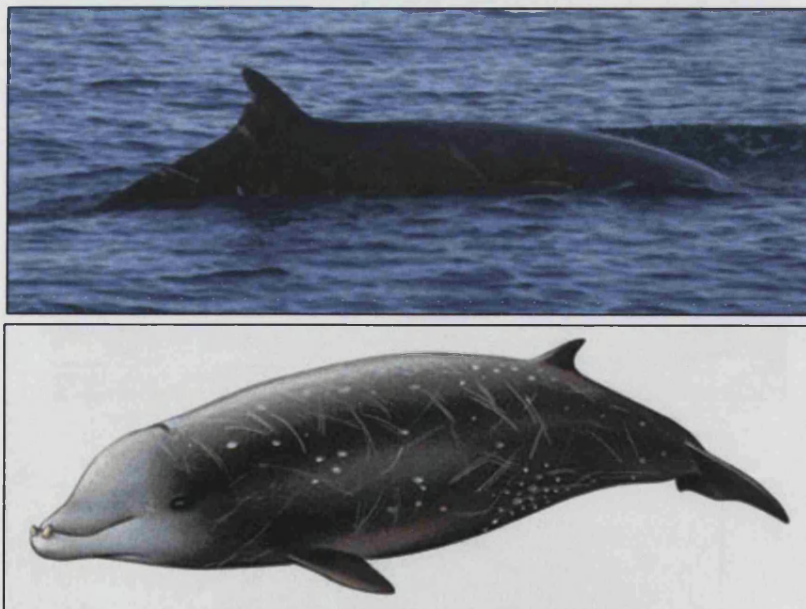
Biología: La abundancia de este delfín se supone que es comparable a la del delfín mular; los datos de densidad en superficie arrojan valores de 0,015 individuos por km² (IC 95%: 0,005-0,046) en 2001-2003 (Gómez de Segura *et al.*, en prensa). Generalmente vive en grupos reducidos, de hasta 20 animales. Habita en aguas de 100 a 1400 m de profundidad, prefiriendo aguas medias y profundas del talud continental (800-1400 m) (Gómez de Segura *et al.*, 2004). Se alimenta sobre todo de cefalópodos oceánicos, entre los que destacan los octópodos epipelágicos, especialmente *Argonauta argo*, que es la presa más abundante (Blanco *et al.*, 2006). Otros cefalópodos frecuentes en su dieta son especies de las familias Ommastrephidae, Histioteuthidae y Onychoteuthidae, que suelen encontrarse en el talud continental medio (600-800 m de profundidad).

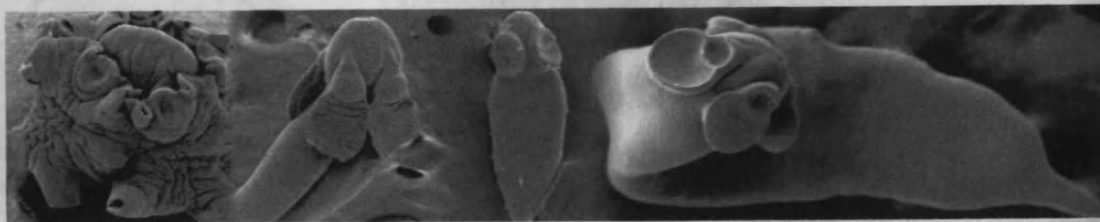
Calderón gris

ZIFIO DE CUVIER (*Ziphius cavirostris*)

Morfología: Es un odontoceto de tamaño grande (aproximadamente 6 m de longitud). Posee una cabeza triangular característica, con una boca en forma de embudo. La coloración corporal es variable, desde tonos grises a marrones. La cabeza y la nuca suelen ser de color más claro y puede presentar líneas o marcas irregulares de color claro a lo largo de todo el cuerpo.

Biología: Parece ser una especie poco frecuente en el Mediterráneo occidental, ya que los avistamientos y varamientos son muy esporádicos (Gómez de Segura *et al.*, 2004). Se han avistado individuos solitarios o grupos muy reducidos de hasta 7 animales, habitualmente en aguas profundas del talud continental (más de 1000 m de profundidad) (Gómez de Segura *et al.*, 2004). Se trata de un cetáceo pelágico capaz de realizar inmersiones profundas y prolongadas. La dieta del zifio de Cuvier en el Mediterráneo es principalmente teutófaga e incluye cefalópodos oceánicos meso o batipelágicos (Blanco y Raga, 2000).

Zifio de Cuvier



ARTÍCULOS INCLUIDOS

4. ARTÍCULOS INCLUIDOS

La presente tesis es el resultado de la compilación de cuatro trabajos de investigación, tres de los cuales se encuentran publicados y uno enviado para publicar en diversas revistas científicas internacionales. El hilo conductor de los cuatro trabajos consiste en el análisis morfológico, genético y ecológico de diferentes larvas de cestodos tetrafilídeos encontradas en varias especies de mamíferos marinos, con el objetivo principal de comprender el significado de su presencia en estos hospedadores.

Agustí, C., F.J. Aznar y J.A. Raga. 2005a. Tetraphyllidean plerocercoids from Western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: a comprehensive morphological analysis. *Journal of Parasitology* 91:83-92.

Agustí C., Aznar F.J., Olson P.D., Littlewood D.T.J., Kostadinova A. y Raga J.A. 2005b. Morphological and molecular characterization of tetraphyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Western Mediterranean. *Parasitology* 130: 461-474.

Agustí, C., F.J. Aznar y J.A. Raga. 2005c. Microtriches of tetraphyllidean metacestodes from Western Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Morphology* 265:176-189.

Aznar, F.J., Agustí, C., Littlewood, D.T.J., Raga, J.A. y Olson, P.D. Insight into the role of cetaceans in the life cycle of the tetraphyllideans (Platyhelminthes: Cestoda). *International Journal for Parasitology*. Enviado.

**4.1. TETRAPHYLLIDEAN PLEROCERCOIDS FROM WESTERN
MEDITERRANEAN CETACEANS AND OTHER MARINE
MAMMALS AROUND THE WORLD: A COMPREHENSIVE
MORPHOLOGICAL ANALYSIS.**

TETRAPHYLLIDEAN PLEROCERCOCIDS FROM WESTERN MEDITERRANEAN CETACEANS AND OTHER MARINE MAMMALS AROUND THE WORLD: A COMPREHENSIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS

Celia Agustí, Francisco Javier Aznar, and Juan Antonio Raga

Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, P.O. Box 22085, 46071 Valencia, Spain. e-mail: celia.agusti@uv.es

ABSTRACT: Tetraphyllidean plerocercoids have occasionally been reported in marine mammals, but they have rarely been described in detail, and the ecological significance of these infections is unclear. We described plerocercoids collected from the mucosa of the terminal colon and rectum, the anal crypts, and the hepatopancreatic ducts of 7 striped dolphins *Stenella coeruleoalba*, 1 Cuvier's beaked whale *Ziphius cavirostris*, and 3 Risso's dolphins *Grampus griseus* from the Spanish Mediterranean. We also examined undescribed plerocercoids from 3 cetacean species from the Atlantic and the Pacific. All plerocercoids had a lanceolate body, and a scolex with an apical sucker and 4 sessile monolocular bothridia. The bothridia had free posterior edges and an accessory sucker at their anterior end. Under light microscopy, the bothridia of some Mediterranean specimens looked bilocular without accessory suckers, but a true accessory sucker was observed in histological sections. A principal component analysis revealed 2 stable clusters of specimens along the first principal component regardless of host species. These "large" and "small" morphotypes are thought to represent early migratory stages of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*. The similarity in scolex morphology, the observation of plerocercoids buried in intestinal regions close to the sites where *M. grimaldii* and *P. delphini* occur, and the coexistence of all larval forms in the same individual hosts would support this hypothesis. Future molecular analysis may confirm it.

Several types of tetraphyllidean metacestodes have been reported in marine mammals. Two of them, *Phyllobothrium delphini* Bosc, 1802 and *Monorygma grimaldii* Moniez, 1889, are well-known merocercoids (terminology for larval cestodes will follow Lenta Chervy [2002]) that have frequently been reported encysted in the subcutaneous blubber and peritoneum of the abdominal cavity, respectively, of most cetaceans and some pinnipeds worldwide (Delyamure, 1955; Dailey and Brownell, 1972; Dailey, 1985; Bester, 1989; Raga, 1994, and references therein). Both types of larvae have a scolex bearing an apical sucker and 4 monolocular bothridia with an accessory sucker, but in *P. delphini* the scolex is large, has folded bothridia, and is connected to the bladder through a short filament, whereas in *M. grimaldii* the scolex is small, has bothridia with simple margins, and is connected to the bladder through a very long filament (Southwell and Walker, 1936; Skrjabin, 1970). These merocercoids are believed to use cetaceans, rarely pinnipeds, as intermediate hosts to infect the definitive hosts, probably sharks; however, the specific identity of the parasites is still unknown (Testa and Dailey, 1977; Walker, 2001; Siquier and Le Bas, 2003).

Reports of tetraphyllidean plerocercoids in marine mammals are comparatively scarce (Table I). Stossich (1898) published a brief description and a schematic picture of a plerocercoid collected from a Risso's dolphin, *Grampus griseus*, that he named *Scolex delphini*. Skrjabin (1972) and Skrjabin and Yurakhno (1987) provided suitable descriptions and drawings of plerocercoids identified as *Scolex pleuronectis* Müller, 1788, collected from 2 marine mammal species (Table I). Finally, 7 reports offered neither detailed descriptions nor micrographs or line drawings of the larvae found; the specimens were identified as *S. pleuronectis* (Aznar et al., 1994; McAlpine et al., 1997; Agustí et al., 1999; Fernández et al., 2003, 2004) or merely as Tetraphyllidea gen. sp. larva (Forrester et al., 1980; Aguilar-Aguilar et al., 2001). According to the available descriptions, plerocercoids are of 2 types, i.e., those having a scolex with an

apical sucker and 4 bilocular bothridia without accessory suckers (Skrjabin, 1972; Skrjabin and Yurakhno, 1987) and those having a scolex with an apical sucker and 4 monolocular bothridia with anterior accessory suckers (Stossich, 1898; Skrjabin, 1972; Fernández et al. 2003, 2004). As in general with most tetraphyllidean plerocercoids found in marine organisms (Avdeeva and Avdeev, 1989; Wojciechowska, 1993; Chambers et al., 2000), the identity of these larvae is not known, although some authors (Skrjabin, 1972; Fernández et al., 2003) have speculated that at least some of them could be an earlier, mobile stage of the cystic forms *P. delphini* and *M. grimaldii*.

During the parasitological examination of striped dolphins *Stenella coeruleoalba*, Cuvier's beaked whales *Ziphius cavirostris*, and Risso's dolphins, stranded on the Mediterranean coasts of Spain, a number of plerocercoids tentatively identified as *S. pleuronectis* were found (Aznar et al., 1994; Agustí et al., 1999; Fernández et al., 2003, 2004). In this study, we provide a detailed description of this material, including histological and scanning electron microscope (SEM) techniques, and of the sites where these larvae occur. In addition, we examined all the available undescribed material from previous surveys (Forrester et al., 1980; McAlpine et al. 1997; Aguilar-Aguilar et al., 2001) and reinterpret some of the structures described in early studies (Skrjabin, 1972; Skrjabin and Yurakhno, 1987). Finally, a morphometric analysis of all available material is carried out. These results are then discussed with respect to the identity of these larvae and the possible role of marine mammals in their life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Morphological description

Specimens from Mediterranean cetaceans: Material for this section comes from parasitological surveys carried out in cetaceans of the Mediterranean coast of Spain (between 40°29'N, 0°27'E and 38°20'N, 0°29'W) (Aznar et al., 1994; Agustí et al., 1999; Fernández et al., 2003, 2004). Seven striped dolphins (3 males, range of total length: 154.5–192.5 cm; 4 females, range of total length: 167–207 cm), 3 Risso's dolphins (1 male, 260 cm; 2 females, range of total length: 292–305 cm), and 1 Cuvier's beaked whale (male, 510 cm) were selected for the morphological study of plerocercoids because these hosts were in good

Received 1 April 2004; revised 7 June 2004; accepted 7 June 2004.

TABLE 1. Reports of tetraphyllidean plerocercoids infecting marine mammals found in the literature.

Code	Host	Locality	Main habitat	Reference
I	<i>Grampus griseus</i> (Cetacea)	N Adriatic (Mediterranean)	Rectum	Stossich (1898)
II	<i>Physeter macrocephalus</i> (Cetacea)	Kuril Islands (NW Pacific)	Stomach, duodenum	Skrjabin (1972)
III	<i>Feresa attenuata</i> (Cetacea)	Florida (Central Atlantic)	Liver	Forrester et al. (1980)
IV	<i>Callorhinus ursinus</i> (Pinnipedia)	Komandor Islands (NW Pacific)	Large intestine	Skrjabin and Yurakhno (1987)
V	<i>Stenella coeruleoalba</i> (Cetacea)	Valencian region (W Mediterranean)	Terminal colon, rectum, anus, bile ducts	Aznar et al. (1994) and Agustí et al. (1999)
VI	<i>Kogia breviceps</i> (Cetacea)	New Brunswick (NW Atlantic)	Duodenum	McAlpine et al. (1997)
VII	<i>Stenella longirostris</i> (Cetacea)	Baja California (Pacific Ocean)	Intestine	Aguilar-Aguilar et al. (2001)
VIII	<i>Grampus griseus</i> (Cetacea)	Valencian region (W Mediterranean)	Terminal colon, rectum, anus, bile ducts	Fernández et al. (2003)
IX	<i>Ziphius cavirostris</i> (Cetacea)	Valencian region (W Mediterranean)	Terminal colon, rectum, anus	Fernández et al. (2004)

condition (codes 2–3 sensu Geraci and Lounsbury, 1993). Previous observations indicated that, in Mediterranean cetaceans, plerocercoids occur preferentially inside the wall of the terminal colon and rectum, in the anal crypts, and in the hepatic and pancreatic ducts. Therefore, parasitological examination was focused on these sites. The liver and pancreas of the Cuvier's beaked whale could not be analyzed. The viscera of Risso's dolphins and Cuvier's beaked whales were frozen before parasitological examination; the viscera of striped dolphins were examined fresh, and most plerocercoids were collected alive.

In all cases, the contents of the last 50 cm of the intestine were flushed with physiological saline through a 0.1-mm mesh sieve, the solid remains being collected in a petri dish with physiological saline. Then, the wall of the terminal colon and rectum and the anal crypts were examined under a stereomicroscope to collect in situ larvae. An attempt was made to collect all worms, but some could not be collected and counted because it was difficult to detect and remove them from the intestinal tissue. In 3 striped dolphins, small pieces (2 × 1 cm) of the terminal colon and the anal canal were cut to examine in situ worms. Tissue pieces were fixed in 10% (v/v) buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The hepatic and pancreatic ducts were opened and examined under a stereomicroscope, and the liver and pancreas were subsequently sliced and washed on a sieve to collect plerocercoids that may have been overlooked.

Plerocercoids were first examined in a petri dish with saline and described as seen under a stereomicroscope. Then, 3 samples were selected. A first sample from all host species was used to make observations under light microscopy, and to take morphometric measurements (see later). These specimens were killed and fixed in hot 70% (v/v) ethanol: from *S. coeruleoalba*, 20 specimens from anal crypts of 4 dolphins (5 from each dolphin), 20 specimens from the liver of 2 dolphins (10 from each dolphin) and 40 from the terminal colon of 2 dolphins (20 from each dolphin); from *G. griseus*, 6 specimens from anal crypts of 1 dolphin, 4 specimens from the liver of a second dolphin, and 6 specimens from terminal colon and rectum of a third dolphin; from *Z. cavirostris*, 12 specimens from anal crypts. Specimens were stained with eosin, dehydrated in 70% (v/v) ethanol, and cleared with lactophenol. Temporary mounts were made on cavity slides to avoid flattening the worms. Drawings were made with the aid of a drawing tube connected to a compound microscope.

A second sample of specimens from *S. coeruleoalba* (5 plerocercoids from the terminal colon, 3 from the anal crypts, and 2 from the hepatopancreatic ducts) were processed for observation either with a vacuum SEM or an environmental scanning electron microscope (ESEM). Specimens were killed and fixed in a hot solution of 10% (v/v) formalin in

Sörensen's phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2). For SEM, plerocercoids were dehydrated in an alcohol series, critical point dried in liquid CO₂, mounted on specimen stubs using conductive carbon paint, sputter coated with gold–palladium to a thickness of 25–30 nm in a BioRad-Sc 500 coating unit and examined under a S-4100 SEM at 5 kV. Specimens for ESEM were washed in saline solution and directly observed with a Philips ESEM XL-30 (with a GSE detector).

A third set of plerocercoids from *S. coeruleoalba* (6 from the terminal colon, 6 from the anal crypts and 6 from the hepatopancreatic ducts) were killed and fixed in hot, buffered 10% (v/v) formalin. Then, specimens were dehydrated through a graded ethanol series, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Longitudinal sections (5 µm) were stained with H&E, mounted in Entellan, and observed under a light microscope.

Voucher specimens have been deposited at the Natural History Museum of London: from *G. griseus* (accession numbers 2003.1.17.9–11), from *Z. cavirostris* (accession numbers 2003.9.9.4–7) and from *S. coeruleoalba* (accession numbers 2003.10.29.21–30).

Specimens from other marine mammals: We searched all available material from other tetraphyllidean plerocercoids in marine mammals (Table 1). Three voucher specimens of tetraphyllidean cestode larvae (Forrester et al., 1980) and 11 specimens of *S. pleuronectis* (McAlpine et al., 1997) were borrowed from the U.S. National Parasite Collection (accession numbers 74586 and 84019, respectively); 4 voucher specimens of Tetraphyllidea gen. sp. larva (Aguilar-Aguilar et al., 2001) were borrowed from the Colección Nacional de Helminthos (National Helminth Collection) of the Universidad Nacional Autónoma de México (accession number 4020). We were unable to find any type or voucher material of the specimens described by Stossich (1898), Skrjabin (1972), and Skrjabin and Yurakhno (1987). The specimens deposited by Forrester et al. (1980), McAlpine et al. (1997), and Aguilar-Aguilar et al. (2001) were preserved as permanent mounts. They were drawn under a compound microscope connected to a drawing tube.

Morphometric analysis

We measured 12 homologous distances (Fig. 1) from drawings of each of the selected specimens from the 3 Mediterranean cetaceans (see earlier). The same distances were measured from drawings of 2 specimens of tetraphyllidean cestode larvae (Forrester et al., 1980), 10 specimens of *S. pleuronectis* (McAlpine et al., 1997), and 2 specimens of Tetraphyllidea gen. sp. larva (Aguilar-Aguilar et al., 2001). (In the latter, the variable DAS [Fig. 1B] could not be measured accurately.) Because no material was available from Skrjabin (1972) and Skrjabin and Yurakhno (1987), measurements were obtained directly from the original

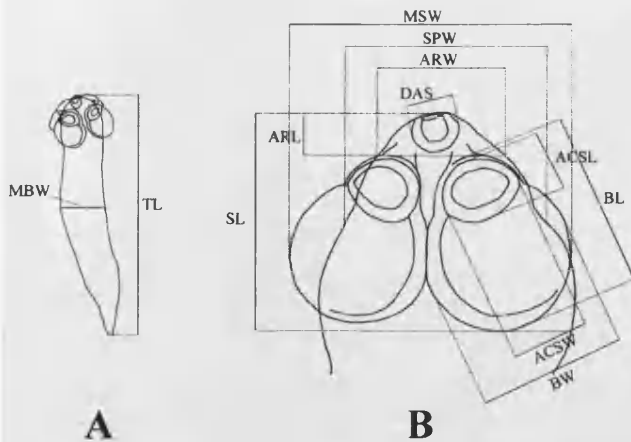


FIGURE 1. Schematic drawing of a tetraphyllidean plerocercoid showing the measurements taken in this study. A. Specimen in toto. B. Scolex. For each specimen, measurements of bothridial structures were obtained from 2 bothridia and averaged. TL, total length; MBW, maximum body width; SL, scolex length; MSW, maximum scolex width; SPW, scolex proper width (measured at the level of the scolex mid-length); ARL, apical region length; ARW, apical region width; DAS, diameter of the apical sucker; BL, bothridium length; BW, bothridium width (equivalent to bothridium loculus width); ACSL, bothridial accessory sucker length; ACSW, bothridial accessory sucker width.

figures 3.4, 3.5, and 3.6 in Skrjabin (1972), and figure 4 in Skrjabin and Yurakhno (1987). It is important to note that specimens depicted in figure 3.4 of Skrjabin (1972) and figure 4 in Skrjabin and Yurakhno (1987) were originally described as bearing bilocular bothridia without accessory suckers. However, Avdeeva and Avdeev (1980, 1989) suggested that the putative upper loculus of these specimens actually was an accessory sucker. Therefore, we measured the upper loculus of these specimens as the accessory sucker shown in Figure 1. We could not measure the plerocercoid drawn by Stossich (1898) (fig. 17 of his article) because a scale was not provided.

Morphometric information was summarized by principal component analysis (PCA) based on the overall covariance matrix. Two PCAs were carried out. The first used the \log_{10} -transformed distances depicted in Figure 1 except the diameter of the apical sucker (DAS), which allowed the use of all specimens in the analysis, including those from *Stenella longirostris*. A second PCA included measures of DAS; thus the specimens from *S. longirostris* were excluded. We used PCA as a purely descriptive tool, with the primary goal being to separate individuals into recognizable clusters; the interpretation of patterns of morphometric variability through the analysis of multivariate allometry was avoided because we did not know a priori whether we were dealing with 1 or multiple groups or whether these groups represented 1 or several species (see for e.g., Klingenberg, 1996; Houle et al., 2002). To assess the stability of eigenvalues and principal component coefficients, we set approximate 95% confidence intervals for these statistics through a jackknife procedure (Gibson et al., 1984; Crowley, 1992).

After groups were identified, we used a stepwise discriminant analysis (SDA) to identify the smallest number of variables that maximize a correct assignment of specimens to their groups. The stability of classification was assessed by the success in predicting the assignment of each specimen with SDAs calculated by leaving the specimen to be classified out of the analysis. These analyses were carried out with the package SPSS v.11.0 for Windows.

RESULTS

In all striped dolphins, plerocercoids were found in all locations examined. Large numbers were observed buried in the mucous layer of the terminal colon and rectum (mean number \pm SD: 3,425 \pm 4,226; range: 30–11,814). All parasites had the

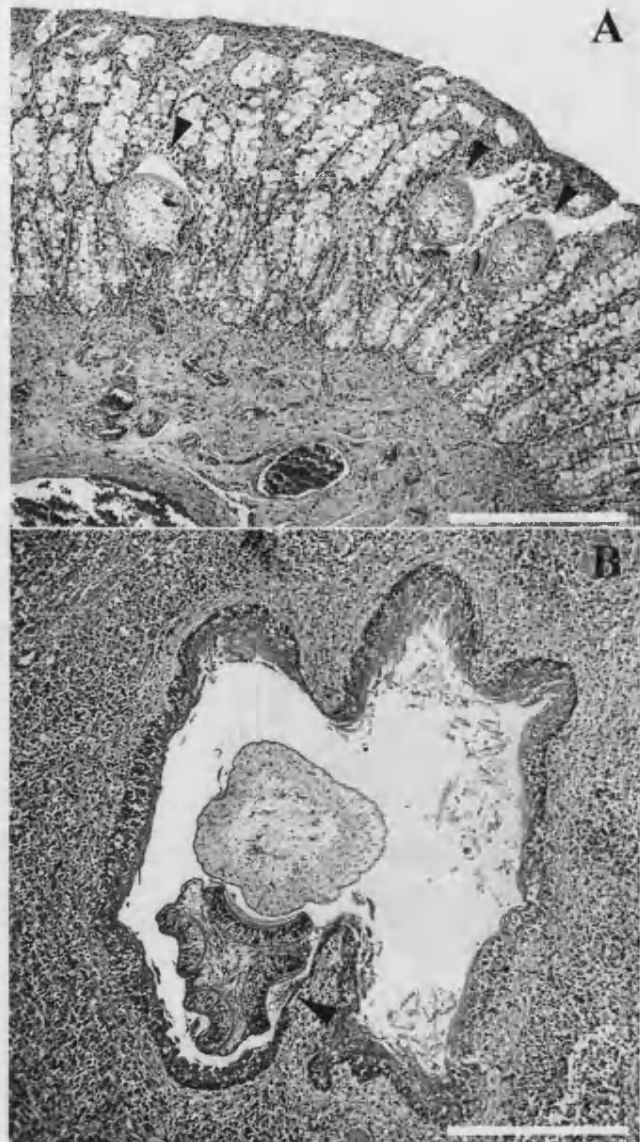


FIGURE 2. Tetraphyllidean plerocercoids in Mediterranean striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*. A. Specimens (pointed by arrowheads) buried in the mucous layer of the terminal colon. B. Specimen inside an anal crypt. Note epithelial desquamation associated with the scolex (arrowhead). Scale: 300 μ m.

scolex oriented toward the basal pole of the lamina propria (Fig. 2A). A number of plerocercoids were also found inside the anal crypts (mean number \pm SD: 1,163 \pm 2,328; range: 15–6,382). The presence of plerocercoids was associated with epithelial desquamation (Fig. 2B). Some plerocercoids were found free in the hepatic and pancreatic ducts (mean number \pm SD: 99 \pm 78; range: 9–237). Plerocercoids also occurred in moderate numbers in the 3 Risso's dolphins analyzed (terminal colon and rectum, mean number \pm SD: 68 \pm 105, range: 6–190; anal crypts, mean number \pm SD: 56 \pm 58, range: 2–117; hepatic and pancreatic ducts, mean number \pm SD: 3 \pm 4, range: 0–8) and the Cuvier's beaked whale (terminal colon and rectum, 14

individuals; anal crypts, 345 individuals). Regardless of host species and location, all larvae shared a similar morphology, i.e., a lanceolate body (Fig. 3A, B), and a scolex with an apical sucker and 4 sessile monolocular bothridia bearing an accessory sucker at their anterior end (Fig. 3C, D). Initially, the bothridia of specimens collected from the terminal colon and rectum looked bilocular (Fig. 3A), but when the bothridia were examined by histological sections (Fig. 4B), a true accessory sucker was clearly observed. In all specimens examined, the posterior end of the bothridial loculus was free (Fig. 4A, C, D). In a random sample of 22 specimens from the terminal colon of striped dolphins, the variability of the free portion ranged from 26.8 to 66.7% of loculus length ($50.0 \pm 12.6\%$), and in 15 specimens from the anal crypts, the range was 19.7–61.1% ($36.2 \pm 11.1\%$).

Undescribed plerocercoids from other geographical areas (samples III, VI, and VII in Table I) had the same morphology as those from Mediterranean cetaceans. However, some of the specimens from *S. longirostris* were in a very poor condition, and the apical sucker could not be clearly observed.

The first 2 axes of the PCA including the specimens from *S. longirostris* accounted for more than 90% of the morphometric variability among specimens (Table II). Jackknifed eigenvalues were similar to those obtained from the actual sample (Table II). Regardless of the host species, PC1 identified 2 clusters of specimens (Fig. 5). The first group (G1) was composed of specimens from the mucosa of the terminal colon and rectum of *S. coeruleoalba* and *G. griseus*, the stomach and duodenum of *P. macrocephalus*, the large intestine of *C. ursinus*, and the anal crypts of *Z. cavirostris*. The second group (G2) included specimens from the anal crypts and hepatopancreatic ducts of *G. griseus* and *S. coeruleoalba*, the duodenum of *K. breviceps*, the liver of *F. attenuata*, the intestine of *S. longirostris*, the stomach and duodenum of *P. macrocephalus*, and the anal crypts of *Z. cavirostris* (Fig. 5). All the original variables loaded positively along PC1. Mean jackknifed coefficients indicated moderate quantitative differences in the association between the original variables and PC1 (Table II). However, the pseudocoeficients were all positive, and the ordination of specimens was stable in each sampling iteration. Coefficients of PC2 were not so stable, thus not so clearly interpretable, because the sign of some coefficients changed in the jackknifed coefficients compared with those of the actual sample (Table II). The PCA excluding specimens from *S. longirostris* and including morphometric information about the variable DAS gave almost identical results to those above (data not shown). Morphometric values for specimens of G1 and G2 in each host species are shown in Tables III, IV, respectively. The SDA, using G1 and G2 as a priori groups, identified the bothridium width (BW) as the best variable that allowed a correct assignation of all specimens to their respective groups (Fig. 6): in all G1 specimens BW was $<110 \mu\text{m}$ (Table III), whereas in all G2 specimens BW was $>150 \mu\text{m}$ (Table IV). It is worth noting that the total length (TL) of the plerocercoid alone allowed a correct classification of 122 (96.8%) out the 126 specimens included in the analysis; the 4 misclassified specimens belonged to G2 (Fig. 6).

DISCUSSION

The results of our study suggest that, regardless of host species and geographic locality, all plerocercoids reported thus far

in marine mammals share the same basic morphology, i.e., all specimens have a lanceolate body and a scolex bearing an apical sucker and 4 monolocular bothridia with an anterior accessory sucker (scolex monolocular with accessory suckers, sensu Yamaguti [1934]). The apical sucker could not be observed in some specimens collected from *S. longirostris* probably because of the poor condition of the material. However, Skrjabin (1972) and Skrjabin and Yurakhno (1987) described some of their specimens as having bilocular bothridia without an accessory sucker. Avdeeva and Avdeev (1980, 1989) suggested that these authors might have misinterpreted the morphology of the bothridia and that all specimens examined by Skrjabin (1972) and Skrjabin and Yurakhno (1987) probably had monolocular bothridia with an anterior accessory sucker. We were unable to find material from the study of Skrjabin (1972) or Skrjabin and Yurakhno (1987), but we think Avdeeva and Avdeev (1980, 1989) were probably right in their suggestion. Avdeeva and Avdeev (1980) examined a large set of plerocercoids of *Phyllobothrium caudatum* and, based on a microscopical examination, concluded that specimens in an early stage of development apparently had monolocular or bilocular bothridia without accessory suckers. However, when serial sections of the scolex were made, all specimens, regardless of their stage of development, were seen to have monolocular bothridia with an accessory sucker. Likewise, we preliminarily described some of the plerocercoids from Mediterranean striped dolphins as bilocular because we based our descriptions on microscopical observations only (Aznar et al., 1994; Agustí et al., 1999). Histological sections, however, allow bilocular bothridia to be distinguished from monolocular bothridia in which the accessory sucker is as large as the posterior loculus of the bothridium; the accessory sucker is separated from the bothridium by a membrane (Fig. 4B, D), whereas the wall of the loculus has no limit with respect to the surrounding tissue (Avdeeva and Avdeev, 1989). Skrjabin (1972) and Skrjabin and Yurakhno (1987) apparently did not carry out any histological analysis of their specimens (there is no mention of these techniques or illustrations of scolex histology). Thus, the likelihood of misinterpretation might have been high.

The PCA defined 2 clusters of specimens in the sample along PC1 that were stable as judged by jackknife estimates. Clustering was independent of host species, geographical locality, or differences in the processing of parasites; individuals of both groups were found to coexist in the same individual hosts in at least 4 cetacean species. PC1 is usually regarded as a general factor reflecting size and size-related shape variation (Gibson et al., 1984). The fact that all PC1 coefficients were positive support this contention. Tables III, IV confirm clear size differences between specimens of both groups regardless of host species. Size differences between plerocercoids had already been noticed and, indeed, the names "small" (for G1) and "large" (for G2) were proposed to differentiate both types (Aznar et al., 1994; Agustí et al., 1999; Fernández et al., 2003, 2004). Large and small plerocercoids are best separated by BW, although TL of the plerocercoid was also a good discriminator between groups (96.8% of correct classifications).

The reason why these plerocercoids are found in marine mammals is puzzling. A major problem is that the relatively simple scolex morphology, which lacks most of the diagnostic traits of adult cestodes, does not allow the identity of the larvae,

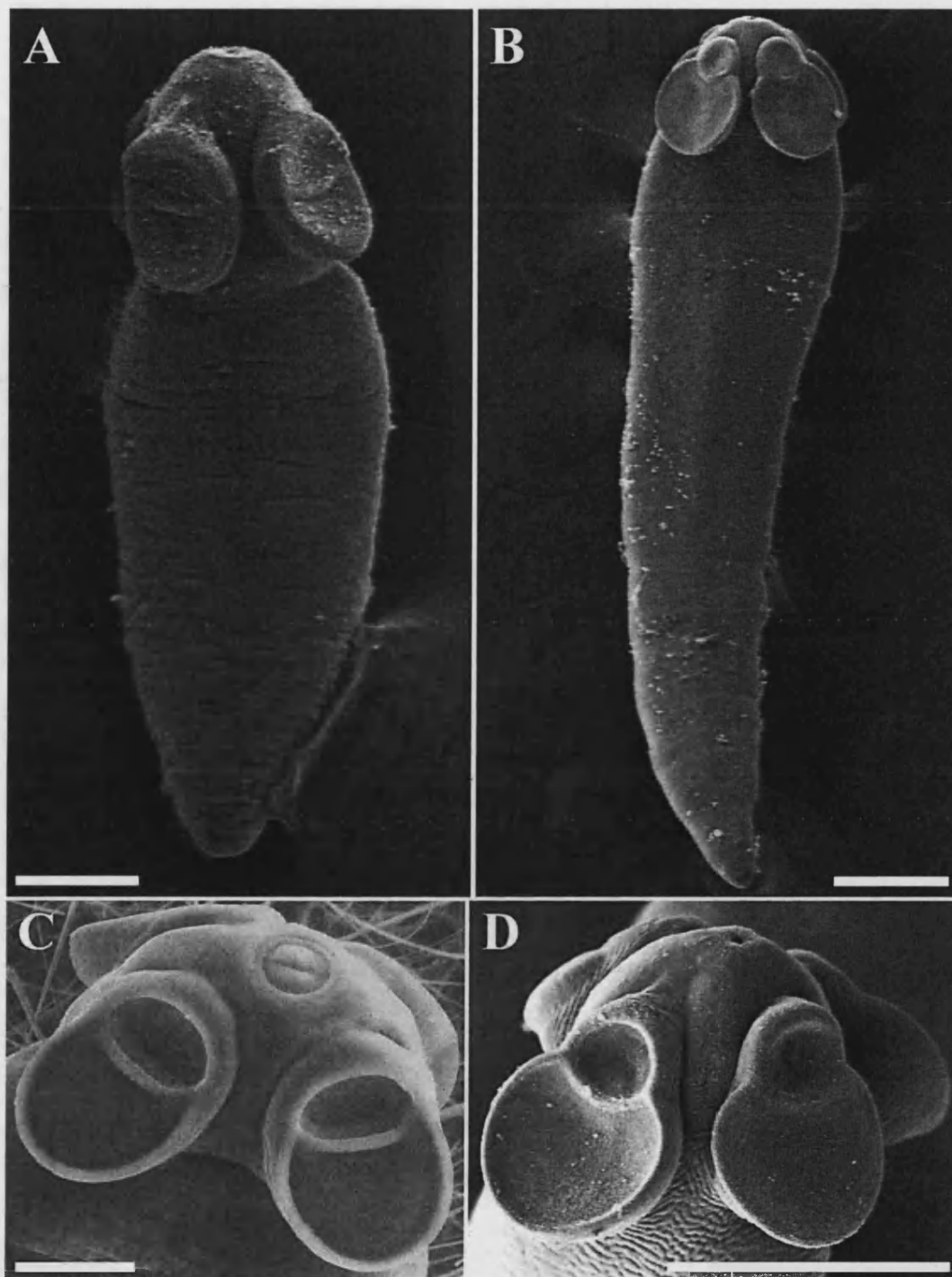


FIGURE 3. Tetraphyllidean plerocercoids from Mediterranean striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*. **A.** Entire specimen from the terminal colon. **B.** Entire specimen from the anal crypts. **C.** Scolex of a specimen from the terminal colon. **D.** Scolex of a specimen from the anal crypts. Micrographs **A**, **B**, and **D** were obtained by SEM, **C** was obtained by ESEM. Scale: 50 μm (**A** and **C**); 250 μm (**B** and **D**).

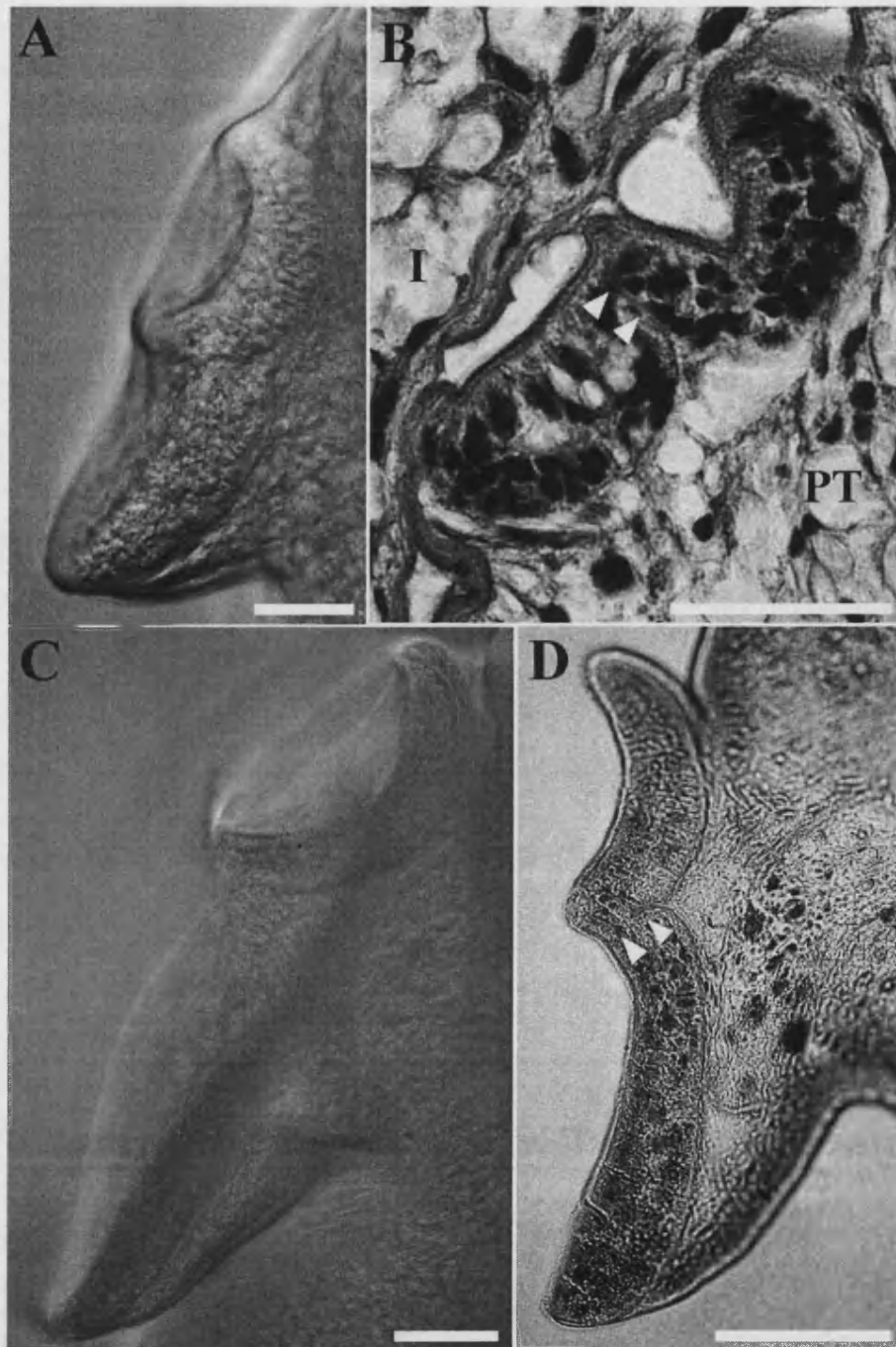


FIGURE 4. Bothridium morphology of tetraphyllidean plerocercoids from Mediterranean striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*. **A.** Bothridium cleared with lactophenol from a specimen collected from the terminal colon. **B.** Histological section through the longitudinal axis of the bothridium in a specimen collected from the terminal colon. **C.** Bothridium cleared with lactophenol from a specimen collected from the anal crypts. **D.** Histological section through the longitudinal axis of the bothridium in a specimen collected from the anal crypts. Arrowheads point to the limit between the accessory sucker and the wall of the bothridium loculus. I, intestine; PT, plerocercoid tissue. Scale: 25 μ m (**A** and **B**); 50 μ m (**C** and **D**).

TABLE II. Principal component analysis (PCA) of 11 morphometric variables from 126 tetraphyllidean plerocercoids collected from 8 species of marine mammals. Mean pseudovalues and 95% confidence intervals (CI) for PCA statistics were obtained through a jackknife procedure (see text for details).

Variable*	PC1			PC2		
	Coefficient	Pseudovalues		Coefficient	Pseudovalues	
		Mean	95% CI		Mean	95% CI
TL	0.287	0.229	0.203, 0.255	-0.053	-0.141	-0.192, -0.092
MBW	0.200	0.234	0.214, 0.254	-0.061	-0.003	-0.031, 0.025
SL	0.191	0.133	0.121, 0.145	0.024	0.070	0.060, 0.080
MSW	0.198	0.144	0.133, 0.155	-0.013	0.011	-0.005, 0.027
SPW	0.184	0.220	0.205, 0.235	-0.006	-0.060	-0.089, -0.031
ARL	0.175	0.231	0.199, 0.263	0.137	0.099	0.069, 0.129
ARW	0.173	0.201	0.182, 0.220	0.049	0.034	0.016, 0.057
BL	0.196	0.198	0.188, 0.208	-0.002	0.034	0.017, 0.051
BW	0.225	0.267	0.246, 0.278	-0.011	0.033	0.017, 0.050
ACSL	0.144	0.194	0.179, 0.209	-0.018	-0.071	-0.113, -0.029
ACSW	0.151	0.186	0.175, 0.197	-0.001	0.052	0.025, 0.078
Eigenvalue	0.425	0.442	0.399, 0.487	0.029	0.029	0.024, 0.031
% Variance explained	85.31	85.20	83.75, 86.65	5.84	5.63	4.89, 6.37
% Variance accumulated	85.31	85.20	83.75, 86.65	91.16	90.83	89.8, 91.86

* TL, total length; MBW, maximum body width; SL, scolex length; MSW, maximal scolex width; SPW, scolex proper width (measured at the level of the scolex mid-length); ARL, apical region length; ARW, apical region width; DAS, diameter of the apical sucker; BL, bothridium length; BW, bothridium width (equivalent to bothridium loculus width); ACSL, bothridial accessory sucker length; ACSW, bothridial accessory sucker width.

thus the ecological significance of infections in marine mammals, to be established. One obvious possibility is that some plerocercoids are simply acquired accidentally with fish or cephalopod prey. This would not easily explain, however, why plerocercoids share the same morphology or select very specific sites, e.g., the anal crypts, where they occur in high numbers. A second possibility is that some plerocercoids may belong to

the Tetrabothriidae, a family with representatives of several genera reproducing in most species of cetaceans and pinnipeds included in this study (Hoberg, 1989; Raga, 1994, and references therein). For instance, individuals of *Strobilocephalus triangularis* usually anchor in the last portion of the large intestine of Mediterranean striped dolphins (Raga and Carbonell, 1985; Agustí et al., 2000), where many plerocercoids were found in this study. However, as far as it is known, tetrabothriid larvae are thought to infect their definitive hosts as uniacetabulate plerocercoids (Hoberg, 1994), and any of the subsequent ontogenetic stages from species infecting marine birds do not seem to bear accessory suckers in their monolocular bothridia (Hoberg, 1987; Galkin, 1996).

Most authors assume that the type of plerocercoids described in this study are larval forms of Tetraphyllidea (Stunkard, 1977; Avdeeva and Avdeev, 1980; Wojciechowska, 1993). In this context, Skrjabin (1972) speculated that the small plerocercoids with bilocular bothridia and the large plerocercoids having monolocular bothridia with accessory suckers he found in sperm whales (Table I) could be earlier sequential stages of the well-known cystic merocercoid *P. delphini*. Two observations seemed to support this hypothesis. First, the bilocular plerocercoids were observed buried in the wall of the stomach and duodenum; Skrjabin (1972) supposed that this was the migration pathway that allowed the larvae to enter the lymphatic or blood vessels to reach the final site where they would become cystic, i.e., the subcutaneous blubber. Skrjabin (1972) postulated that the bilocular form was the previous stage of the monolocular form; the bilocular form would become monolocular by transformation of the anterior loculus of the bothridia into an accessory sucker. As discussed above, however, because the bilocular forms might also be monolocular with accessory suckers, morphological changes between both forms would be even simpler, involving only modifications in size and shape. Second,

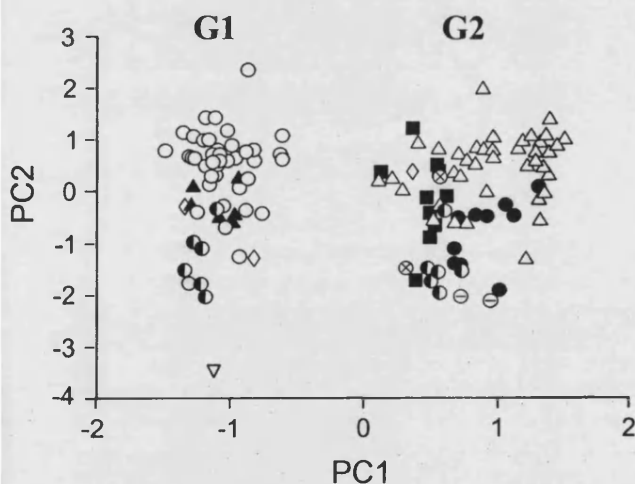


FIGURE 5. Scatterplot of the 2 first principal components performed on 11 morphometrical variables of 126 tetraphyllidean plerocercoids collected from 8 marine mammal species. G1 refers to Group 1, and G2 to Group 2 (see text for details). Specimens from the terminal colon and rectum of *Stenella coeruleoalba* (○) and *Grampus griseus* (▲); the stomach and duodenum of *Physeter macrocephalus* (◇); the anal crypts of *Z. cavirostris* (●); the large intestine of *Callorhinus ursinus* (▽); the anal crypts and bile ducts of *S. coeruleoalba* (△) and *G. griseus* (●); the duodenum of *Kogia breviceps* (■); the liver of *Feresa attenuata* (⊗), and the intestine of *Stenella longirostris* (⊖).

TABLE III. Range (mean \pm SD) of measurements of tetraphyllidean plerocercoids from Group 1 (see Table I, Fig. 5, and text for details). Numbers in brackets are the range of values reported in the original publication. Measurements in micrometers.

Variable*	Sample†				
	II‡ (n = 2)	IV (n = 1)	V (n = 40)	VIII (n = 6)	IX (n = 6)
TL	778–1,086 (932 \pm 218) [350–750]	662 [310–670]	355–789 (541 \pm 106)	542–1,013 (769 \pm 180)	783–957 (907 \pm 67)
MBW	178–276 (227 \pm 69)	354 [350–380]	107–253 (175 \pm 34)	167–208 (181 \pm 16)	148–270 (198 \pm 50)
SL	138–195 (166 \pm 40)	137	143–235 (178 \pm 21)	144–202 (171 \pm 22)	135–172 (152 \pm 14)
MSW	170–211 (191 \pm 29)	251	161–253 (198 \pm 22)	154–221 (191 \pm 25)	168–185 (179 \pm 7)
SPW	170	228	100–211 (153 \pm 25)	139–173 (148 \pm 13)	112–153 (131 \pm 16)
ARL	32	11	15–83 (44 \pm 12)	31–46 (36 \pm 5)	19–32 (25 \pm 5)
ARW	89–114 (101 \pm 17)	86	92–193 (126 \pm 24)	96–118 (109 \pm 10)	67–120 (90 \pm 21)
DAS	49–65 (57 \pm 11) [40–55]	51 [60–63]	54–75 (62 \pm 5)	50–60 (55 \pm 4)	51–69 (58 \pm 7)
BL	94–114 (104 \pm 14) [90–100]	117 [100–120]	109–153 (128 \pm 11)	101–126 (115 \pm 11)	105–117 (109 \pm 5)
BW	52–81 (66 \pm 21) [60–80]	77 [80–90]	67–103 (82 \pm 8)	70–84 (76 \pm 6)	63–83 (73 \pm 7)
ACSL	44–65 (54 \pm 15)	55	53–77 (64 \pm 6)	51–62 (58 \pm 4)	52–55 (54 \pm 1)
ACSW	52–73 (62 \pm 15)	66	61–88 (73 \pm 6)	55–68 (64 \pm 5)	55–70 (62 \pm 5)

* TL, total length; MBW, maximum body width; SL, scolex length; MSW, maximal scolex width; SPW, scolex proper width (measured at the level of the scolex midlength); ARL, apical region length; ARW, apical region width; DAS, diameter of the apical sucker; BL, bothridium length; BW, bothridium width (equivalent to bothridium locus width); ACSL, bothridial accessory sucker length; ACSW, bothridial accessory sucker width.

† Sample codes as in Table I.

‡ n Refers to the number of specimens measured, except in samples II and IV, in which it refers to the number of drawings from original publications used to take measurements.

Skrjabin (1972) observed several types of *P. delphini* in the blubber that he interpreted as further sequential ontogenetic stages. The presumably younger forms of *P. delphini* had a scolex with a morphology similar to the plerocercoids bearing monolocular bothridia with accessory suckers, whereas the older forms progressively had bothridia with folded edges, as typically observed in most specimens of *P. delphini*. Skrjabin (1972) speculated that the other merocercoid usually found in marine mammals, *M. grimaldii*, could also originate from bilocular plerocercoids that are transformed in monolocular forms. However, Skrjabin (1972) did not indicate whether these plerocercoids were morphologically different from those becoming *P. delphini*.

Skrjabin's (1972) hypothesis is attractive because it sheds light on the long-standing question as to how *P. delphini* and *M. grimaldii* infect the cetacean as mobile forms. In fact, some of our data could be consistent with this hypothesis. First, all the plerocercoids examined are morphologically homogeneous, having a scolex with an apical sucker and 4 monolocular bothridia with anterior accessory suckers, similar to *P. delphini* and *M. grimaldii* (Southwell and Walker, 1936; Skrjabin, 1970). Second, these plerocercoids occur worldwide in species of cetaceans from several families (Table I), as is the case with the cystic forms (Delyamure, 1955; Dailey and Brownell, 1972; Dailey, 1985; Bester, 1989; Raga, 1994, and references therein). Third, the small (G1) and large (G2) plerocercoids, as well as specimens of *P. delphini*, or *M. grimaldii*, or both, have been observed to coexist in the same individual hosts in the 3 cetacean species from the Mediterranean (data not shown). It is important to emphasize that much effort was expended searching for plerocercoids. Fernández et al. (2003) suggested that these types of plerocercoids might have been frequently overlooked in most cetacean species because of their small size and their main occurrence inside the gut wall. Perhaps, not surprisingly, most previous parasitological surveys reported only large plerocercoids that were more easily detectable (Fig. 5; Table IV). Fourth, in the 3 Mediterranean cetacean species analyzed in this study, most plerocercoids were found buried in the mucous layer of the terminal colon and rectum and inside the anal crypts. These sites are close to the habitats where *M. grimaldii* and *P. delphini* mostly occur, i.e., the abdominal peritoneum and the subcutaneous blubber of the anogenital area, respectively (Delyamure, 1955; Testa and Dailey, 1977). Other observations, however, are more difficult to fit in Skrjabin's (1972) scheme. No transitional form was found in PC1 between small and large plerocercoids (Fig. 5). This means that either the transformation of small plerocercoids into large is very rapid or that such transformation actually does not occur. In some cetacean species, e.g., striped and Risso's dolphins, small and large plerocercoids select different penetration areas. Perhaps small plerocercoids belong to one of the merocercoid types, and large plerocercoids to the other, and each one uses different ways to reach the blood or lymphatic vessels. Still, we were unable to find, as was Skrjabin (1972), plerocercoids crossing the submucosa of the intestine to reach the underlying vessels. Finally, we do not know why some large plerocercoids are found in the hepatic and pancreatic ducts. This observation is even more intriguing because we failed to find small plerocercoids in these sites.

In summary, the evidence available thus far suggests that,

TABLE IV. Range (mean \pm SD) of measurements of tetraphyllidean plerocercoids from Group 2 (see Table I, Fig. 5, and text for details). Numbers in brackets are the range of values reported in the original publication. Measurements in micrometers.

Variable*	Sample†						
	II‡ (n = 1)	III (n = 2)	V (n = 40)	VI (n = 10)	VII (n = 2)	VIII (n = 10)	IX (n = 6)
TL	1,865 [1,100–1,700]	1,860–2,350 (2,105 \pm 346)	821–4,261 (2,345 \pm 1,012)	1,380–1,860 (1,575 \pm 179)	1,915–1,926 (1,920 \pm 8)	1,900–3,357 (2,514 \pm 479)	2,167–3,000 (2,693 \pm 294)
MBW	284	360–520 (440 \pm 113)	247–765 (452 \pm 108)	200–300 (242 \pm 40)	617–681 (649 \pm 45)	430–780 (574 \pm 103)	490–542 (519 \pm 25)
SL	349	308–346 (327 \pm 27)	306–565 (445 \pm 63)	308–417 (390 \pm 35)	298–306 (302 \pm 6)	321–450 (367 \pm 40)	317–375 (354 \pm 21)
MSW	357	388–396 (392 \pm 6)	365–634 (500 \pm 71)	396–500 (451 \pm 34)	332–447 (389 \pm 81)	438–654 (537 \pm 83)	375–442 (400 \pm 25)
SPW	203	296–308 (302 \pm 9)	273–483 (365 \pm 53)	200–396 (302 \pm 70)	215–249 (232 \pm 24)	219–563 (389 \pm 110)	217–296 (256 \pm 30)
ARL	81	42–88 (65 \pm 32)	47–165 (101 \pm 34)	29–83 (56 \pm 16)	47	38–86 (64 \pm 15)	42–79 (53 \pm 14)
ARW	162	171–196 (183 \pm 18)	184–389 (279 \pm 48)	154–221 (189 \pm 22)	140–164 (152 \pm 17)	175–388 (281 \pm 72)	133–171 (153 \pm 15)
DAS	70 [62–87]	69–73 (71 \pm 3)	73–115 (94 \pm 9)	75–102 (94 \pm 8)	—§	73–107 (88 \pm 10)	71–92 (84 \pm 8)
BL	255 [130–170]	206–240 (223 \pm 24)	225–390 (319 \pm 42)	206–308 (280 \pm 30)	233–235 (234 \pm 2)	227–329 (278 \pm 33)	231–296 (265 \pm 24)
BW	178 [80–170]	182–183 (183 \pm 1)	164–291 (233 \pm 33)	170–223 (208 \pm 19)	170–174 (172 \pm 3)	195–271 (233 \pm 27)	178–208 (190 \pm 12)
ACSL	114	75–85 (80 \pm 7)	96–151 (120 \pm 13)	88–142 (121 \pm 16)	95–102 (98 \pm 5)	90–140 (107 \pm 16)	85–116 (103 \pm 11)
ACSW	112 [70–110]	92–121 (106 \pm 21)	109–187 (146 \pm 15)	108–163 (138 \pm 14)	106–134 (120 \pm 20)	108–160 (124 \pm 16)	102–125 (115 \pm 8)

* TL, total length; MBW, maximum body width; SL, scolex length; MSW, maximal scolex width; SPW, scolex proper width (measured at the level of the scolex midlength); ARL, apical region length; ARW, apical region width; DAS, diameter of the apical sucker; BL, bothridium length; BW, bothridium width (equivalent to bothridium locus width); ACSL, bothridial accessory sucker length; ACSW, bothridial accessory sucker width.

† Sample codes as in Table I.

‡ n Refers to the number of specimens measured, except in sample II, in which it refers to the number of drawings from original publications used to take measurements.

§ This measurement could not be taken because of the poor condition of specimens.

regardless of host species, marine mammals appear to be infected with 2 types of morphologically similar tetraphyllidean plerocercoids, which can be distinguished largely by size-related differences. Some circumstantial data support a possible re-

lationship of these larvae with the merocercoids *P. delphini* and *M. grimaldii*, as previously suggested. We are carrying out molecular analyses to investigate this hypothesis and to shed light on the specific identity of *P. delphini* and *M. grimaldii*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues from the Marine Zoology Unit, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, for their assistance with the necropsies of animals, to the staff of the Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental of the University of Valencia for their technical assistance with the SEM and ESEM, and to Ana Resendes, from the Universitat Autònoma de Barcelona, for her assistance with the histological techniques and her comments on the manuscript. Thanks are also due to E. Hoberg, B. B. Georgiev, J. Barrett, M. Domingo, and A. Kostadinova for their comments and assistance. The loan of specimens from the National Helminth Collection of the Universidad Nacional Autónoma de México and the U.S. National Parasite Collection is much appreciated. Cetaceans were collected, thanks to an agreement between the Conselleria de Territorio y Vivienda (Generalitat Valenciana) and the University of Valencia. This work has been supported by projects DGES PB96-0801 and REN2003-01758 from the Spanish Government. E.J.A. benefits from a "Ramón y Cajal" contract from the MCYT of Spain. The first author holds a doctoral fellowship from the Conselleria de Cultura, Educació i Ciència of the Generalitat Valenciana.

LITERATURE CITED

AGUILAR-AGUILAR, R., R. G. MORENO-NAVARRETE, G. SALGADO-MALDONADO, AND B. VILLA-RAMÍREZ. 2001. Gastrointestinal helminths

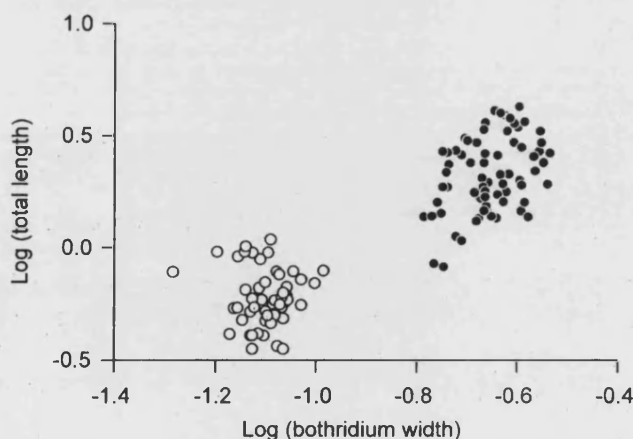


FIGURE 6. Scatterplot of log total length of plerocercoid on log bothridium width of 126 tetraphyllidean plerocercoids collected from 8 marine mammal species. Group 1 (○); Group 2 (●) (see Fig. 5 and text for details).

- of spinner dolphins *Stenella longirostris* (Gray, 1828) (Cetacea: Delphinidae) stranded in La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico. *Comparative Parasitology* **68**: 272–274.
- AGUSTÍ, C., F. J. AZNAR, F. E. MONTERO, AND J. A. RAGA. 1999. The ontogeny of *Scolex pleuronectis* (Tetraphyllidae) in the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. In Fifth international symposium on fish parasites. Book of abstracts. Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budejovice, Czech Republic, p. 3.
- , AND J. A. RAGA. 2000. Structure of intestinal helminth communities of *Stenella coeruleoalba* from the Western Mediterranean. In 14th annual conference of the European Cetacean Society. Book of abstracts. Printing Office University College, Cork, Eire, p. 51–52.
- AVDEEVA, N. V., AND V. V. AVDEEV. 1980. Peculiarities of morphogenesis of adhesive organs of some plerocercoids of the collective genus *Scolex* (Tetraphyllidae) and their identification. *Parazitologiya* **14**: 242–250. [In Russian.]
- , AND ———. 1989. Plerocercoids of the cestodes of order Tetraphyllidae (problems in identification). Biologo-Poshvennyi Institut DVO AN SSSR, Vladivostok, Russia, 74 p. [In Russian.]
- AZNAR, F. J., J. A. BALBUENA, AND J. A. RAGA. 1994. On the identity and emigration of *Scolex pleuronectis* larvae (Cestoda) in the striped dolphin. *European Research on Cetaceans* **8**: 243–246.
- BESTER, M. N. 1989. Endoparasites of the subantarctic fur seal *Arctocephalus tropicalis* from Gough Island. *South African Journal of Zoology* **24**: 363–365.
- CHAMBERS, C. B., T. H. CRIBB, AND M. K. JONES. 2000. Tetraphyllidean metacystodes of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of *in vitro* cultivation to identify them. *Folia Parasitologica* **47**: 285–292.
- CROWLEY, P. H. 1992. Resampling methods for computation-intensive data analysis in ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23**: 405–447.
- DAILEY, M. D. 1985. Diseases of Mammalia: Cetacea. In *Diseases of marine animals*, vol. IV, part 2, O. Kinne (ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, p. 805–847.
- , AND R. L. BROWNELL. 1972. A checklist of marine mammal parasites. In *Mammals of the sea. Biology and medicine*, S. H. Ridgway (ed.). C. C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, p. 528–589.
- DELYAMURE, S. L. 1955. Helminth fauna of marine mammals (ecology and phylogeny). Izdatel'stvo Akademii Nauk S.S.S.R., Moscow, Russia, 517 p. [English translation by M. Raveh, 1968. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel, 552 p.]
- FERNÁNDEZ, M., C. AGUSTÍ, F. J. AZNAR, AND J. A. RAGA. 2003. Gastrointestinal helminths of Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Western Mediterranean. *Diseases of Aquatic Organisms* **55**: 73–76.
- , F. J. AZNAR, F. E. MONTERO, B. B. GEORGIEV, AND J. A. RAGA. 2004. Gastrointestinal helminths of Cuvier's beaked whales, *Ziphius cavirostris*, from the Western Mediterranean. *Journal of Parasitology* **90**: 418–420.
- FORRESTER, D. J., D. K. ODELL, N. P. THOMPSON, AND J. R. WHITE. 1980. Morphometrics, parasites and chlorinated hydrocarbon residues of pygmy killer whales from Florida. *Journal of Mammalogy* **61**: 356–360.
- GALKIN, A. K. 1996. The postlarval development of the scolex of *Tetraphyllus erostris* (Cestoda: Tetrabothriidae) and phylogenetic essentials of this process. *Parazitologiya* **30**: 315–323. [In Russian.]
- GERACI, J. R., AND V. J. LOUNSBURY. 1993. Marine mammals ashore. A field guide for strandings. Texas A&M University Sea Grant College Program, Galveston, Texas, 305 p.
- GIBSON, A. R., A. J. BAKER, AND A. MOEED. 1984. Morphometric variation in introduced populations of the common myna (*Acridotheres tristis*): An application of the jackknife to principal component analysis. *Systematic Zoology* **33**: 408–421.
- HOBERG, E. P. 1987. Recognition of larvae of the Tetrabothriidae (Eucestoda): Implications for the origin of tapeworms in marine homeotherms. *Canadian Journal of Zoology* **65**: 997–1000.
- . 1989. Phylogenetic relationships among genera of the Tetrabothriidae (Eucestoda). *Journal of Parasitology* **75**: 617–626.
- . 1994. Order Tetrabothriidae Baer, 1954. In *Keys to the cestode parasites of vertebrates*, L. F. Khalil, A. Jones, and R. A. Bray (eds.). C.A.B. International, Wallingford, U.K., p. 295–304.
- HOULE, D., J. MEZEY, AND P. GALPERN. 2002. Interpretation of the results of common principal components analyses. *Evolution* **56**: 433–440.
- KLINGENBERG, C. P. 1996. Multivariate allometry. In *Advances in morphometrics*, L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. Slice (eds.). Plenum Press, New York, p. 23–49.
- LENTA CHERVY. 2002. The terminology of larval cestodes or metacystodes. *Systematic Parasitology* **52**: 1–33.
- MCALPINE, D. F., L. D. MURISON, AND E. P. HOBERG. 1997. New records for the pygmy sperm whale, *Kogia breviceps* (Physeteridae) from Atlantic Canada with notes on diet and parasites. *Marine Mammal Science* **13**: 701–704.
- RAGA, J. A. 1994. Parasitismus bei den Cetacea. In *Handbuch der Säugetiere Europas*, Band 6/I A Meeressäuger, Teil I A: Wale und Delphine, I, D. Robineau, R. Duguy, and M. Klima (eds.). Aula-Verlag Wiesbaden, Germany, p. 132–179.
- , AND E. CARBONELL. 1985. New dates about parasites of *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae) in the Western Mediterranean Sea. *Investigations on Cetacea* **17**: 207–213.
- SIQUIER, G. F., AND A. E. LE BAS. 2003. Morphometrical categorization of *Phyllobothrium delphini* (Cestoidea, Tetraphyllidae) cyst from Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei* (Cetacea, Delphinidae). *Latin American Journal of Aquatic Mammals* **2**: 95–100.
- SKRJABIN, A. S. 1970. The first finding of larvae of the cestode *Monorygma delphini* (Tetraphyllidae, Phyllobothriidae) in Antarctic whales. *Zoologicheskii Zhurnal* **49**: 1721–1722. [In Russian.]
- . 1972. Larvae of cestodes of the genus *Phyllobothrium* Beneden, 1850 (Tetraphyllidae), parasites of whales and other marine animals. *Parazitologiya* **6**: 426–434. [In Russian.]
- , AND M. V. YURAKHNO. 1987. The first finding of larvae of *Scolex pleuronectis* Müller, 1788 in pinnipeds. *Parazitologiya* **21**: 743–744. [In Russian.]
- SOUTHWELL, T., AND A. J. WALKER. 1936. Notes on a larval cestode from a fur seal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **30**: 91–100.
- STOSSICH, M. 1898. Note parassitologiche. *Bollettino della Società Adriatica di Scienze Naturali in Trieste* **18**: 1–10.
- STUNKARD, H. W. 1977. Studies on tetraphyllidean and tetrahyndridean metacystodes from squids taken on the New England Coast. *Biological Bulletin* **153**: 387–412.
- TESTA, J., AND M. D. DAILEY. 1977. Five new morphotypes of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Tetraphyllidae), their relationship to existing morphotypes, and their zoogeography. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* **76**: 99–110.
- WALKER, W. A. 2001. Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the Northern North Pacific, Bering Sea, and Sea of Okhotsk. *Marine Mammal Science* **17**: 264–275.
- WOJCIECHOWSKA, A. 1993. The tetraphyllidean and tetrabothriid cercariae from Antarctic bony fishes. I. Morphology. Identification with adult forms. *Acta Parasitologica* **38**: 15–22.
- YAMAGUTI, S. 1934. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 4. Cestodes of fishes. *Japanese Journal of Zoology* **6**: 1–112.

**4.2. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF TETRAPHYLLIDEAN
MERCERCERCOIDS (PLATYHELMINTHES: CESTODA) OF
STRIPED DOLPHINS (*STENELLA COERULEOALBA*) FROM
THE WESTERN MEDITERRANEAN.**

Morphological and molecular characterization of tetraphyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Western Mediterranean

C. AGUSTÍ¹*, F. J. AZNAR¹, P. D. OLSON², D. T. J. LITTLEWOOD², A. KOSTADINOVA^{1,3} and J. A. RAGA¹

¹ Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, P.O. Box 22085, 46071 Valencia, Spain

² Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK

³ Department of Biodiversity, Central Laboratory of General Ecology, Bulgarian Academy of Sciences, 2 Gagarin Street, 1113 Sofia, Bulgaria

(Received 27 July 2004; revised 10 September 2004; accepted 10 September 2004)

SUMMARY

Two types of tetraphyllidean merocercoids, *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*, are well known from most cetaceans world-wide. The role of cetaceans in the life-cycle of these merocercoids is unclear because their specific identity is as yet unknown. The problem is compounded by poor descriptions of both merocercoids. We used light and scanning electron microscopy, and histological techniques to provide a thorough description of merocercoids collected from 11 striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, from the Spanish Mediterranean. We also described, for the first time, specimens of *P. delphini* with immature proglottides. Our merocercoids were morphologically similar to those described previously, except in the structure of the apical organ. Intra- and inter-sample variability in the morphology of the apical organ suggested that it degenerates during larval development. A subsample of 16 specimens of *P. delphini* and *M. grimaldii* was characterized for the D2 variable region of the large subunit ribosomal RNA gene (LSU) and compared with published tetraphyllidean cestode LSU sequences. *P. delphini* showed 2 unique signatures that differed from one another by a single base, whereas all sequences of *M. grimaldii* were identical. This suggests that each type may represent a single species, contrary to previous speculations based on morphological data. All merocercoid specimens formed a clade together with *Clistobothrium montaukensis*. Based on the low degree of divergence, all specimens of this clade are predicted to be congeneric.

Key words: Tetraphyllidea, merocercoid, *Phyllobothrium delphini*, *Monorygma grimaldii*, *Clistobothrium montaukensis*, striped dolphin, molecular diagnostics.

INTRODUCTION

Tetraphyllidean merocercoids (terminology of larval cestodes follows Chervy, 2002) have been reported frequently from most cetacean species and some pinnipeds world-wide (Delyamure, 1955; Dailey & Brownell, 1972; Dailey, 1985; Bester, 1989; Raga, 1994, and references therein). Generally, 2 types have been recognized, i.e. *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) van Beneden, 1868, encysted in the subcutaneous blubber, usually in the abdominal area, and *Monorygma grimaldii* (Moniez, 1889) Baylis, 1919, encysted mainly in the peritoneum of the abdominal cavity. Both types of larvae have a scolex bearing an apical sucker and 4 monolocular

bothridia with accessory suckers, but the scolex of *P. delphini* is large, has folded bothridia and is connected to a bladder through a short, thick filament, whereas the scolex of *M. grimaldii* is small, has bothridia with simple margins and is connected to the bladder through a very long and thin filament (Southwell & Walker, 1936; Skrjabin, 1970). Occasionally, other larval cestode types with bothridia lacking accessory suckers have been recorded, encysted in the subcutaneous blubber of some cetaceans (Markowski, 1955; Skrjabin, 1964; Siquier & Le Bas, 2003).

Even though *P. delphini* and *M. grimaldii* have been reported frequently from marine mammals in the last two centuries, there are surprisingly few accurate descriptions, especially of the scolex. This could be explained, at least in part, by the difficulty to recover the invaginated scolex intact, especially in the case of *M. grimaldii*, whose small scolex is invaginated at the end of a very thin and fragile filament. To date, only Mendonça (1984) has published

* Corresponding author: Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, P.O. Box 22085, 46071 Valencia, Spain. Tel: +34 96 354 36 85. Fax: +34 96 354 37 33. E-mail: celia.agusti@uv.es

histological sections of the scolex of *P. delphini* in which the gross morphology can be distinguished. Siquier & Le Bas (2003) were apparently the first to use scanning electron microscopy (SEM) to describe the scolex of *P. delphini*. Neither method has been employed in the case of *M. grimaldii*.

Most authors believe that *P. delphini* and *M. grimaldii* use marine mammals, especially cetaceans, as a means of infecting predatory or scavenging elasmobranchs (e.g. Southwell & Walker, 1936; Johnston & Mawson, 1939; Dollfus, 1964; Testa & Dailey, 1977; Walker, 2001). However, the specific identity of these larvae is not known. In the case of *P. delphini*, some authors (Guiart, 1935; Delyamure, 1955; Testa & Dailey, 1977) have recognized different morphotypes. Dailey (1985) suggested that these morphotypes may represent distinct species, whereas morphological uniformity in *M. grimaldii* suggests that these larvae represent a single species. There is, however, the possibility that observed 'morphotypes' represent different phases of development of the same species (Siquier & Le Bas, 2003). The use of molecular systematic techniques is necessary to help clarify these taxonomic issues.

During the parasitological examination of striped dolphins, *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), stranded on the Mediterranean coasts of Spain, a number of specimens of *P. delphini* and *M. grimaldii* were obtained. In this study we provide detailed morphological and morphometric descriptions of both types of larvae by using light microscopy, SEM, and fine histology. We also found specimens of *P. delphini* with immature proglottides and provide, for the first time, a description of this material, which may be useful for shedding light on the ontogenetic changes that occur in these larvae. Finally, we provide a molecular characterization of both larval types in order to further elucidate the identities and phylogenetic affinities of *P. delphini* and *M. grimaldii*.

MATERIALS AND METHODS

Morphological description

Eleven striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, stranded during 1998–2001 along the Western Mediterranean coast of Spain (between 40°13'N, 0°17'E and 37°52'N, 0°45'W) were necropsied for parasites. The sample consisted of 3 males (range of total length 155–193 cm) and 8 females (range of total length 154–211 cm). The subcutaneous blubber, peritoneum and mesenteries of the abdominal cavity were inspected immediately and a sample of the cestodes encysted removed while living. All striped dolphins were infected with both larval types. About 25 specimens of each type were collected from each dolphin (the total number of merocercoids per dolphin was not counted). All merocercoids were washed in saline (9‰), examined in a Petri dish with saline and

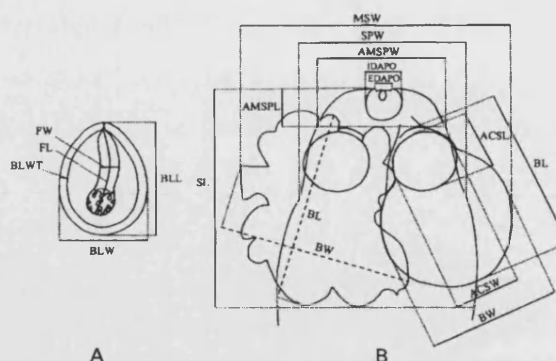


Fig. 1. Schematic drawings of a tetraphyllidean merocercoid showing the measurements taken in this study. (A) Specimen *in toto*. (B) Scolex (bothridium on the left – *Phyllobothrium delphini*; bothridium on the right – *Monorygma grimaldii*). For each specimen, measurements of bothridial structures were obtained from 2 bothridia and averaged. BLL, bladder length; BLW, bladder width; BLWT, bladder wall thickness; FL, filament length; FW, filament width; SL, scolex length; MSW, maximum scolex width; SPW, scolex proper width (measured at the level of the scolex mid-length); AMSPL, apical modification of scolex proper length; AMSPW, apical modification of scolex proper width; EDAP, external diameter of the apical organ; IDAPO, internal diameter of the apical organ; BL, bothridium length; BW, bothridium width (equivalent to bothridium loculus width); ACSL, bothridial accessory sucker length; ACSW, bothridial accessory sucker width.

described under a stereomicroscope. The entire filament and scolex were subsequently removed from the cyst. The filament was cut near to the scolex and left in saline until the scolex was fully evaginated.

Three samples of merocercoids were used. The first sample was used to make observations under compound and stereomicroscopes, and to take morphometric measurements. The bladder and filament were drawn in 20 specimens of each morphotype. The bladder was drawn from live specimens that had been in the refrigerator for at least 1 h, allowing the worms to relax. The bladder of relaxed specimens acquired an oblong, flattened shape in all specimens, thus minimizing the potential deformation of the bladder in active animals. The filament and the width of the bladder wall were drawn in 70% (v/v) ethanol-fixed material. The scoleces of 20 live specimens of each morphotype from each of 2 dolphins were fixed in hot 70% (v/v) ethanol by shaking them vigorously in a circular movement. They were then stained with eosin, washed in tap water, dehydrated in 70% (v/v) ethanol and cleared with lactophenol. Temporary mounts were made on cavity slides to avoid deforming the scoleces. Drawings were made with the aid of a drawing tube connected to a compound or stereo light microscope. The internal diameter of the apical organ was visible only in 13 individuals of *P. delphini*. We measured 16 homologous metrics (Fig. 1) from drawings of each selected specimen.

Three specimens of *P. delphini* showing initial proglottization were fixed in 70% (v/v) ethanol and drawn. Characters described in Fig. 1 were measured from drawings of proglottized specimens, except for the internal diameter of the apical organ, which was not visible, and the bladder size because the bladder of these specimens was not collected intact. Seven proglottides of *P. delphini* were fixed in 70% (v/v) ethanol, stained with haematoxylin, dehydrated in an ethanol series, cleared in xylene and mounted in Canada balsam. Three additional proglottides were used to obtain transverse sections. Proglottides were processed as indicated above, and thick transverse sections were obtained by cutting the proglottides with a razor blade after they were hardened in xylene. All measurements are in micrometres unless otherwise stated.

A second sample of 5 specimens of *P. delphini* and 5 specimens of *M. grimaldii* was processed for observation with a vacuum scanning electron microscope (SEM) or an environmental scanning electron microscope (ESEM). Specimens were killed and fixed in a hot solution of 10% (v/v) formalin in Sørensen's phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2). For SEM, merocercoids were dehydrated in an ethanol series, critical-point dried in liquid CO₂, mounted on specimen stubs using conductive carbon paint, sputter coated with gold-palladium to a thickness of 25–30 nm in a Bio-Rad Sc 500 coating unit and examined in a S-4100 SEM at 5 kV. Specimens for ESEM were washed in saline solution and observed directly with a Philips ESEM XL-30 with a gaseous secondary electron detector.

A third set of specimens was processed for histology. Seven scoleces of *M. grimaldii* and 10 of *P. delphini* were fixed in hot buffered 10% (v/v) formalin, dehydrated through a graded ethanol series, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Sections (7–10 µm) were stained with haematoxylin and eosin, mounted in Entellan (Merck) and observed under a light microscope. Two proglottides of *P. delphini* fixed in 70% (v/v) ethanol were similarly processed.

Voucher specimens have been deposited in the helminth collection of the Natural History Museum, London (NHM; accession nos.: *Phyllobothrium delphini*, BMNH 2003.10.29.1-10; *Monorygma grimaldii*, BMNH 2003.10.29.11-20).

Molecular analysis

In addition to the collections described above, 8 specimens of *P. delphini* and 8 specimens of *M. grimaldii* from 3 host individuals were preserved in 95% ethanol for molecular diagnostic analysis. Specimens of *P. delphini* showing proglottization (see above) were excluded due to their poor condition of preservation, and scoleces were retained for

vouchers prior to genomic DNA (gDNA) extraction and deposited in the helminth collection of the NHM (Accession nos. BMNH 2004.8.18.6-21). gDNA was extracted from the specimens using a Qiagen DNeasyTM tissue kit and used for PCR as described by Olson *et al.* (2003). A fragment (~1400 bp) of the nuclear large subunit ribosomal RNA gene (LSU; spanning domains D1-D3) was amplified using primers LSU5 (5'-TAG GTC GAC CCG CTG AAY T TA AGC-3') and 1200R (5'-GCA TAG TTC ACC ATC TTT CGG-3') and the middle portion spanning the variable D2 region (~650 bp) sequenced bidirectionally using internal primers 300F (5'-CA A GTA CCG TG A GGG AAA GTT-3') and ECD2 (5'-CTT GGT CCG TGT TTC AAG ACGGG-3'). This region of the LSU has proven informative for both diagnostic and phylogenetic work in tetraphyllidean and related taxa (e.g. Brickle *et al.* 2001; Reyda & Olson, 2003). Contiguous sequences were assembled and edited using SequencherTM (GeneCodes Corp., ver. 4), and leading and trailing regions of the sequences without overlap were removed prior to analysis. Sequences are available from GenBank under Accession nos. AY741591-1606.

Sequences were screened using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to confirm their orthology with the LSU genes of cestodes, and aligned by eye using MacClade ver. 4.06 (Maddison & Maddison, 2000) together with available tetraphyllidean LSU sequences (21 taxa). Phylogenetic affinities of the merocercoid sequences with previously characterized adult tetraphyllidean taxa ($n=19$) were estimated by Bayesian analysis using MrBayes ver. 3.b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Based on the results of MrModeltest ver. 1.1b (Nylander, 2002; a simplified version of ModelTest by Posada & Crandall, 1998), a general time reversible model of nucleotide substitution incorporating among-site rate variation was specified, and the analysis run over 1 million generations, sampling topologies every 100th generation. Other program parameters were as specified in Olson *et al.* (2003). A consensus tree was constructed using the 'sumt' command with a 'burnin' value of 250 and the 'con-type=allcompat' option. Trees were rooted using *Echeneibothrium maculatum* Woodland, 1927 based on prior analysis of tetraphyllidean and related LSU sequences (see Reyda & Olson, 2003). Comparisons of uncorrected genetic distances (shown parenthetically as the percentage difference; i.e. no. of substitutions/no. of sites compared*100) were calculated using PAUP* ver. 4.0b10 (Swofford, 2001) based on a re-alignment of taxa from the clade (marked with an asterisk in Fig. 5) including only the unique merocercoid sequences together with *Clistobothrium montaukensis* Ruhnke, 1993. The high similarity of these sequences necessitated only a single 1 bp insertion in the alignment.

Table 1. Measurements of *Phyllobothrium delphini* from the present study and the literature

(Scolex measurements have been taken from evaginated scoleces, except for those of Testa & Dailey (1977). Range (mean \pm s.d.) [coefficient of variation (%)]. Measurements in micrometres unless otherwise stated.)

Variable†	Sample‡											
	I n=20/40§	II n=3	III n=?/1#	IV n=3	V n=15	VI N=10	VII n=2	VIII n=?	IX n=?	X n=2	XI n=5	XII n=?
BLL (mm)	5–15.1 (10.3 \pm 2.5) [24.7]	—	10–12	5–8.5 (6.7)	4.5–10.2 (6.8)	4.9–11.2 (7.8)	5–7.7*	4–13.5	9–15	6–6.5	12–18	14–22.3 (16.7)
BLW (mm)	2.3–9.3 (5.9 \pm 1.9) [31.4]	—	3–4	5–6 (5.5)	4–5 (4.8)	4–6.1 (5.3)	3.4–6.1*	3–7.5	5–8	4.5	6–10	5–9 (6.9)
BLWT	173–833 (479 \pm 172) [35.8]	—	—	612–918 (734)	748–1400	—	—	—	—	500–800	—	120–260 (200)
FL (mm)	1.5–12.9 (7.4 \pm 2.7) [36.4]	20.7–29.3 (24.2 \pm 4.6)	—	6.3–9.6 (8.4)	2.4–4.7 (3.3)	2.7–4.1	—	c.8.5–20.5	0.4–1.4	2.5	12–14	5–12 (8.8)
FW	774–2564 (1634 \pm 505) [30.9]	710–1002 (874 \pm 149)	—	816–1305 (1074)	1050–2110 (1660)	—	—	—	—	—	2000–4000	1200–2800 (1780)
SL	1220–2300 (1640 \pm 228) [13.9]	1571–2413 (1954 \pm 426)	1400	1122–1428 (1265)	1050–1250 (1140)	2400–2700	1167–1500*	c.2400*	—	1200*	2000 2000*	1280–1650 (1435) 1143*
MSW	1600–3200 (2163 \pm 361) [16.7]	1898–3175 (2609 \pm 651)	1200	979–1305 (1189)	1120–1670 (1320)	1800–2100 2182*	1967–2000*	c.3200*	c.1730*	1356*	3000 3000*	1540–2000 (1760) 1643*
SPW	860–2227 (1385 \pm 273) [19.7]	1255–1556 (1450 \pm 169)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AMSPL	40–420 (197 \pm 101) [51.3]	71–127 (93 \pm 30)	—	—	—	—	167–267*	c.500*	—	133*	120 333*	250*
AMSPW	400–1130 (769 \pm 157) [20.5]	694–825 (738 \pm 76)	—	—	370–500 (430)	771	1033*	c.900*	—	467*	1000*	321*
EDAPO	40–130 (74 \pm 20) [27.1]	65–159 (111 \pm 47)	—	—	—	101*	67*	70 95*	56*	67*	c.130*	64*
IDAPO	50–170 (91 \pm 30) [32.6]	—	—	71–97 (84)	78–112 (94)	103–123	167–200*	—	122*	—	120–150	240–400 (314) 143*
BL	1185–2090 (1471 \pm 212) [14.4]	1434–2032 (1791 \pm 316)	—	—	c.1240*	c.1310*	1083–1100*	1150 2000*	678–700 c.890*	1033*	1567*	884*

BW	1025–1880 (1303 ± 210) [16·2]	1102–1651 (1438 ± 294)	—	—	c.1100*	c.1140*	1017–1117*	500 1200*	867–886 c.940*	700*	1583*	955*
ACSL	220–325 (274 ± 29) [10·7]	273–349 (313 ± 38)	—	—	—	—	c.270–333*	276*	200*	244*	133–200*	277*
ACSW	230–360 (288 ± 33) [11·5]	333–382 (351 ± 27)	190	203–267 (239)	120–170 (144) c.210*	102–180 (138)	—	160–200 250*	207–226 206*	280 278*	200–350 242–250*	360–600 (442) 321*

† Abbreviations as in Fig. 1.

‡ Host and source of the sample: I. *Stenella coeruleoalba*, present study; II. *Stenella coeruleoalba*, present study (proglottized specimens); III. *Delphinus delphis*, Baer (1932); IV. *Delphinus delphis* and *Lagenorhynchus obscurus*, type 9 of Testa & Dailey (1977); V. *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba* and *Globicephala melas*, Raga (1985); VI. *Globicephala melas*, Balbuena (1991); VII. whales (host not specified), Skrjabin (1972); VIII. *Kogia breviceps*, Johnston & Mawson (1939); IX. *Physeter catodon*, type 6 of Delyamure (1955); X. *Physeter catodon*, Skrjabin (1964); XI. *Arctocephalus australis*, Southwell & Walker (1936); XII. *Arctocephalus pusillus*, Mendonça (1984).

* Measured from published drawing Raga (1985): measurements from Fig. 43 Balbuena (1991): measurements from Fig. 3.1.11 Skrjabin (1972): scolex measurements from Figs 4 and 5, bladder measurements from Figs 7 and 8 Johnston & Mawson (1939): measurements from Figs 13 and 14 Delyamure (1955): measurements from Fig. 129 Skrjabin (1964): measurements from Fig. 2 Southwell & Walker (1936): measurements from Figs 2 and 3 Mendonça (1984): measurements from Fig. 2.

§ Measurements of BLL, BLW, BLWT, FL and FW are based on 20 specimens; the remaining measurements are based on 40 specimens.

Measurements of SL, MSW and ACSW are based on 1 specimen; the number of specimens used to measure BLL and BLW is not reported.

Terminology

Some of the morphological terms have been inconsistently and ambiguously used to describe *M. grimaldii* and *P. delphini*. For instance, many authors have used the term 'myzothrychnus' to refer to the apical region of the scolex of these larvae (Baer, 1932; Southwell & Walker, 1936; Dollfus, 1964; Testa & Dailey, 1977; Mendonça, 1984; Raga, 1985; Balbuena, 1991; Soulier, 1993; Siquier & Le Bas, 2003), but the use of this term has often been questioned (Wardle & McLeod, 1952; Euzet, 1959; Cairra, Jensen & Healy, 1999). To avoid further confusion, in this study we have adopted the workable definitions provided by Cairra *et al.* (1999) for some conficting characters of the scolex. We used 'apical modification of scolex proper' for the apical region of *P. delphini* and *M. grimaldii* because this region is externally modified as a mobile, dome-shaped structure, and its tissue is internally continuous with that of the scolex proper (see Results). Likewise, we used 'apical organ' for the structure we observed on the tip of the scolex because there was a discrete, histological boundary between this structure and the surrounding tissue (Cairra *et al.* 1999).

RESULTS

Morphological description

Phyllobothrium delphini (Bosc, 1802) van Beneden, 1868

Description of meroceroide (Table 1, Figs 2 and 3)

Bladder sub-spherical to ovoid, with scolex invaginated at end of short thick filament connected to bladder. Filament with 2 osmoregulatory canals running longitudinally along each side, forming zigzag pattern. Scolex with 4 monolocular bothridia with folded margins and round anterior accessory sucker, occupying 14·8–22·4% (18·8 ± 1·8%, *n* = 40) of bothridium length (Fig. 2A and B). Loop of osmoregulatory canal enters each bothridium and runs parallel to bothridium margin, at distance of about quarter of bothridial diameter. Each bothridium connected to scolex proper by short stout stalk (BS in Fig. 2C and D). Posterior half of bothridial locus free. Anterior part of bothridium with free rims. Margins of bothridial locus unite with upper part of accessory sucker (Fig. 2A and B).

Apical modification of scolex proper dome-shaped in frontal plane, conical in sagittal plane, and cruciform in apical view, with bothridia located between cross-arms. Apical modification of scolex proper neither invaginable nor retractable, but continuously moving and deforming in live specimens. Histological sections of this region reveal muscular bundles and some basophilic cells (Fig. 2E). No histological differences between apical region and scolex proper (Fig. 2C and E).

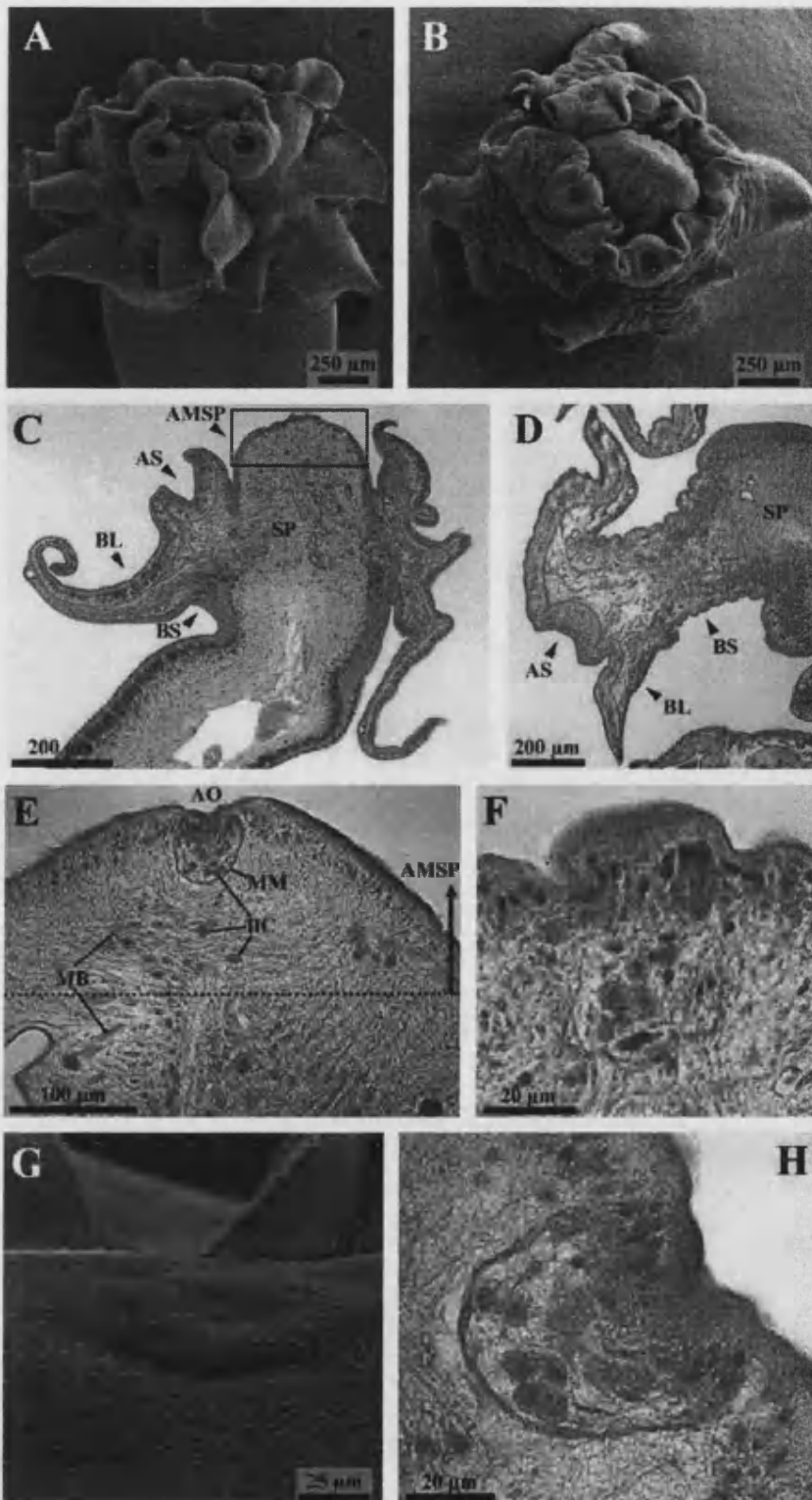


Fig. 2. Scanning electron micrographs and histological sections of the scolex of *Phyllobothrium delphini* collected from Mediterranean striped dolphins. (A) Lateral view of scolex; (B) apical view of scolex; (C) longitudinal section of the scolex; (D) transversal section of the scolex; (E) longitudinal section of the apical modification of scolex proper and the apical organ; (F) longitudinal section of the apical organ protruded; (G) apical organ (SEM); (H) longitudinal section of the apical organ resembling a collapsed cup. AO, apical organ; AMSP, apical modification of scolex proper; AS, accessory sucker; BL, bothridial locus; BC, basophilic cells; BS, bothridial stalk; MB, muscular bundles; MM, muscular membrane; SP, scolex proper.

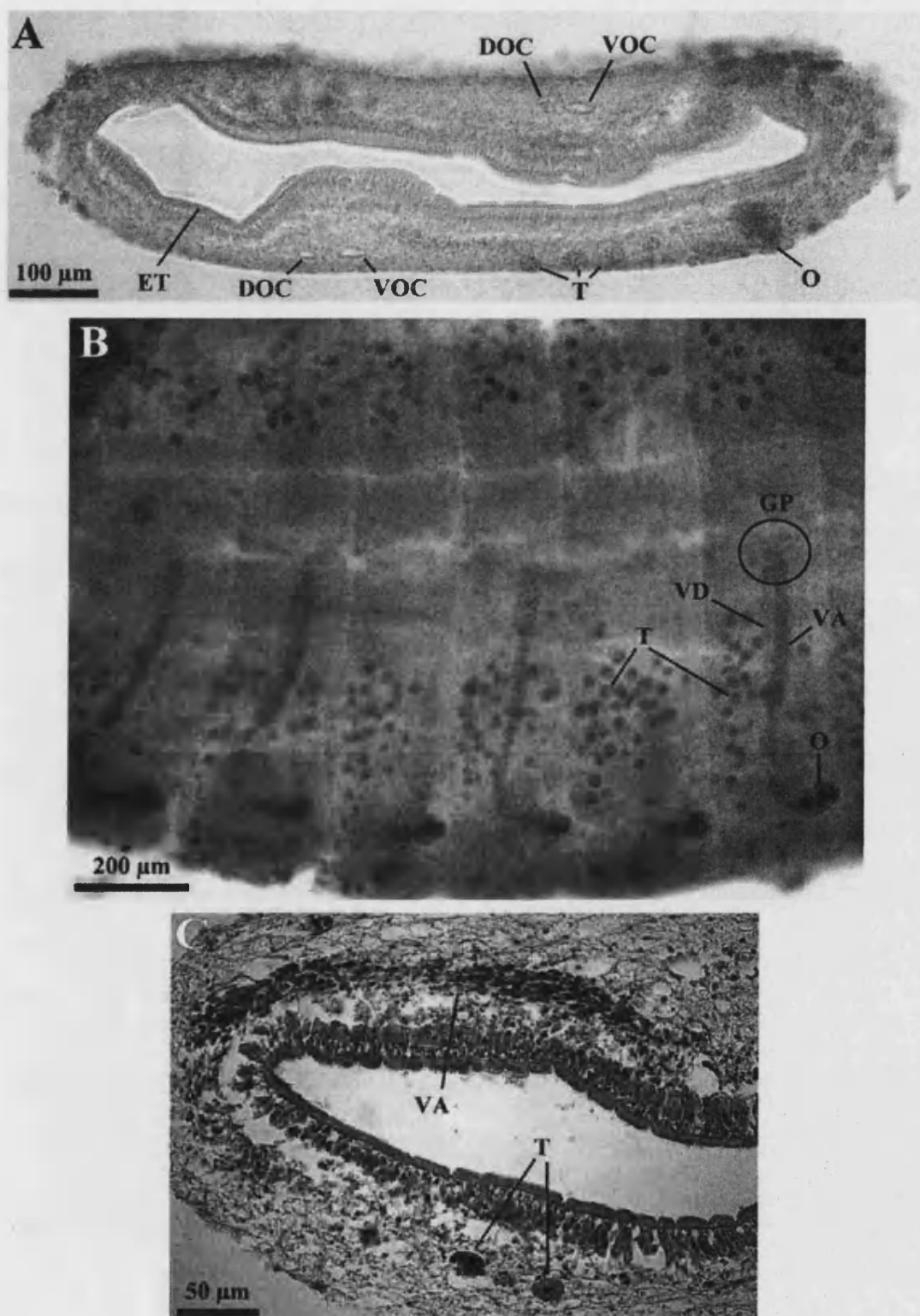


Fig. 3. Immature proglottides in a filament of *Phyllobothrium delphini*. The filament of this specimen is invaginated (i.e. the external tegument is internal), and laterally flattened (osmoregulatory canals appear running longitudinally along its central axis). (A) Transverse thick section of a proglottis; (B) whole mount; (C) transverse histological section of a proglottis. ET, external tegument; DOC, dorsal osmoregulatory canal; GP, approximate location of the genital pore; O, primordium of ovary; VD, primordium of vas deferens; T, testes; VA, primordium of vagina; VOC, ventral osmoregulatory canal.

Apical organ located at tip of apical modification of scolex proper. Some shape variability was found: in some individuals, apical organ resembled collapsed cup (Fig. 2E, G and H), whereas in other individuals it was protruded and more rounded (Fig. 2F). Internally, apical organ with sac-like structure delimited by thin muscular membrane, containing basophilic cells but not radial muscles (Fig. 2F and H).

Nine specimens of *P. delphini* collected from 1 striped dolphin showed initial proglottization along filament. In some individuals, only anterior part of filament proglottized, whereas in others the entire filament was proglottized. Proglottized individuals with filaments much longer than non-proglottized individuals (Table 1). Scolex of proglottized worms either evaginated or invaginated within filament, and morphologically very similar to that of non-proglottized individuals from same dolphin. Accessory suckers of bothridia occupying 16.6–19.0% ($17.6 \pm 1.3\%$, $n=3$) of bothridium length. Apical organ dome-shaped in all individuals. Scolex structures larger than in non-proglottized specimens (Table 1). Proglottis length increases further from scolex. Neck measured in 2 specimens 274 and 295 in length. Proglottides with genital primordia of male and female systems in most developed specimen are shown in Fig. 3. Round testes clearly distinguishable in 7 proglottides (Fig. 3A, B and C), numbering 90–134 (107 ± 18) per proglottis and measuring 20–31 (26 ± 3 , $n=42$). Large group of cells (probably primordium of ovary) observed in middle of proglottides (Fig. 3A and B). Thick cord of cells (probably primordium of vagina) arises from ovary and runs transversally to lateral margin (Fig. 3B and C). Thin cord of cells (probably primordium of vas deferens) runs parallel to thick cord (Fig. 3B). According to arrangement of cell cords, genital pores appeared irregularly alternating (Fig. 3B).

Site: encysted in the subcutaneous blubber, especially in the posterior body half of striped dolphins.

Monorygma grimaldii (Moniez, 1889) Baylis, 1919

Description of merocercoid (Table 2, Fig. 4)

Bladder ovoid to almond-shaped, connected to internal long slender filament ending with invaginated scolex. In live specimens, filament tangled in fluid filled bladder; when larva fixed in 70% (v/v) ethanol, fluid precipitates around filament, such that it appears to be surrounded by amorphous porous parenchyma. Filament bears 2 osmoregulatory canals running longitudinally along each edge, tracing close zigzag pattern. Scolex bears 4 sessile monolocular bothridia with simple edges and anterior accessory sucker; accessory sucker occupies 25.6–41.1% ($31.7 \pm 3.3\%$, $n=40$) of bothridial length (Fig. 4A and B). Bothridia slightly tapered anteriorly, attached to scolex proper only by anterior part of bothridial loculus. Margins of bothridial loculus unite laterally with accessory sucker (Fig. 4A).

Apical modification of scolex proper large, sub-spherical, dome-shaped, neither invaginable nor retractable, but continuously moving and deforming in live specimens. Histological sections of this region showed muscular bundles and basophilic cells (Fig. 4C and D). No histological differences between apical region and scolex proper (Fig. 4C and D).

Apical organ located at tip of apical modification of scolex proper, cup-shaped in some individuals (Fig. 4E and F) and conical or knob-shaped in others (Fig. 4G and H). Histological sections revealed that apical organ has sac-like structure, is slightly muscular and with some basophilic cells but lacks radial muscle fibres, and is delimited from surrounding tissue by thin muscular membrane (Fig. 4F and H).

Site: Most worms encysted in the peritoneum of the abdominal cavity of striped dolphins; some of them also in the peritoneum of testes and the mesentery of the rectum and uterus.

Molecular analysis

A total of 586 characters was included in the analysis of the D2 variable region of the LSU gene, of which 250 were parsimony informative. Three unique LSU signatures were present among the merocercoid sequences, and a consensus tree resulting from Bayesian analysis (Fig. 5) showed that these formed a clade together with *C. montaukensis* and a previously published sequence of a metacestode collected from squid (*Loligo gahi*; see Brickle *et al.* 2001). Sequences of *P. delphini* were identical except for 1 which differed by a single G/A transition (0.16%), whereas all sequences of *M. grimaldii* were identical and differed from the LSU signature of *P. delphini* by only 3 C/T transitions (0.48%), the most common substitution class due to the regular formation of G-T, as well as G-C, pair bonds in the secondary structure of rDNA (see comparison of substitution classes in Olson *et al.* 2001). The genetic distance between the signature of *P. delphini* with that of *C. montaukensis* was 1.7% and between *M. grimaldii* and *C. montaukensis* was 1.1%, whereas between the metacestode from *Loligo gahi* and *C. montaukensis* was 0.32%.

DISCUSSION

The morphology of the tetraphyllidean merocercoids described in this study agrees well with the available descriptions of *P. delphini* and *M. grimaldii*, except for the structure of the apical organ. In some descriptions of both types of larvae, the apical organ was not described (Linton, 1905; Baer, 1932; Guiart, 1935; Garippa, Scala, & Pais, 1991). However, most authors described or illustrated the apical organ as an apical sucker (Southwell & Walker, 1936; Delyamure, 1955; Dollfus, 1964; Skrjabin, 1964;

Tetracyllidean merocercoids from mediterranean striped dolphins

469

Table 2. Measurements of *Monorygmia grimaldii* from the present study and the literature

(Scolex measurements have been taken from invaginated scoleces, except for data of the present study and those of Skrjabin (1970). Range (mean \pm s.d.) [coefficient of variation (%)]. Measurements in micrometres unless otherwise stated.)

Variable†	Sample‡					
	I n = 20/40§	II n = 1	III n = 1	IV n = 15	V n = 5	VI n = ?
BLL (mm)	5.7–27.3 (13.7 \pm 5.4) [39.6]	—	25	18–25 (21)	18.5–26	9.8–25
BLW (mm)	3.9–11.5 (7.7 \pm 2.3) [30.0]	—	—	15–18 (16)	13.2–20.5	6.6–21
BLWT	385–1312 (843 \pm 241) [28.7]	—	—	890–1070	—	400–1000
FL (mm)	3–415.7 (151.8 \pm 122.9) [81.0]	—	—	240–423 (286)	185–280	81–226
FW	178–390 (270 \pm 64) [23.6]	—	246	520–630 (540)	350–820	500–1400
SL	498–869 (680 \pm 76) [11.1]	517*	—	c.680*	250–442 c.660*	260–540 581*
MSW	414–877 (602 \pm 100) [16.6]	c.320*	520	c.390*	530–670 c.370*	500–550 572*
SPW	172–549 (318 \pm 76) [23.9]	—	—	—	—	c.400*
AMSPL	104–262 (183 \pm 35) [19.1]	117*	—	167*	133*	188*
AMSPW	204–475 (334 \pm 69) [20.7]	208*	—	226–288 (274) 207*	208–223 183*	309*
EDAPO	26–96 (57 \pm 15) [27.0]	—	—	—	—	47*
IDAPO	53–131 (84 \pm 20) [24.1]	—	97–102	100–125 (118)	96–110	68–74 75*
BL	375–599 (469 \pm 60) [12.8]	367*	—	500–550 (530) c.450*	500–550 c.430*	250–390 356*
BW	220–480 (308 \pm 55) [17.7]	c.120*	—	310–350 (340)	310–330	150–230 239*
ACSL	107–196 (148 \pm 22) [15.0]	100*	—	67*	83*	76–114 127*
ACSW	133–248 (172 \pm 25) [14.8]	100*	85–102	130–150 (139)	120–150	95–137 155*

† Abbreviations as in Fig. 1.

‡ Host and source of the sample: I. *Stenella coeruleoalba*, present study; II. *Lagenorhynchus acutus*, drawing of Baylis (1919) reproduced in Dollfus (1964); III. *Tursiops truncatus*, Dollfus (1964); IV. *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba*, *Tursiops truncatus* and *Globicephala melas*, Raga (1985); V. *Globicephala melas*, Balbuena (1991); VI. *Physeter catodon* and *Balaenoptera physalus*, Skrjabin (1970).

* Measured from published drawing: Dollfus (1964): measurements from Fig. 7 (Baylis, 1919); Raga (1985): measurements from Fig. 42; Balbuena (1991): measurements from Fig. 3.1.10; Skrjabin (1970): measurements from Fig. 1.

§ Measurements of BLL, BLW, BLWT, FL and FW are based on 20 specimens; the remaining measurements are based on 40 specimens.

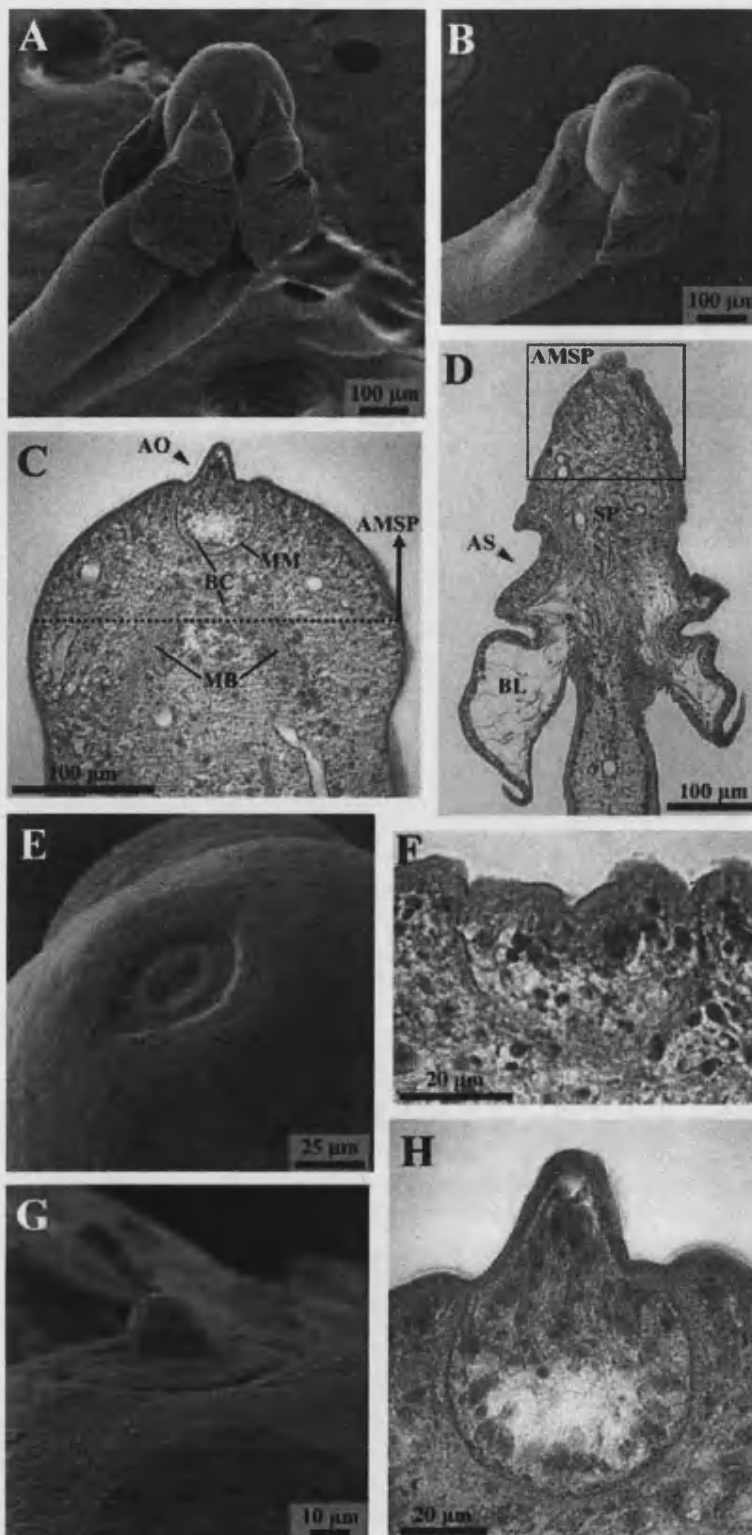


Fig. 4. Scanning electron micrographs and histological sections of the scolex of *Monorygma grimaldii* collected from Mediterranean striped dolphins. (A) Lateral view of scolex; (B) apical view of scolex; (C) longitudinal section of the apical modification of scolex proper and the apical organ; (D) longitudinal section of the scolex; (E) non-everted apical organ (SEM); (F) longitudinal section of a cup-shaped apical organ; (G) everted apical organ to form a knob-like structure (SEM); (H) longitudinal section of an everted apical organ. AO, apical organ; AMSP, apical modification of scolex proper; AS, accessory sucker; BL, bothridial locus; BC, basophilic cells; MB, muscular bundles; MM, muscular membrane; SP, scolex proper.

Tetraphyllidean merocercoids from mediterranean striped dolphins

471

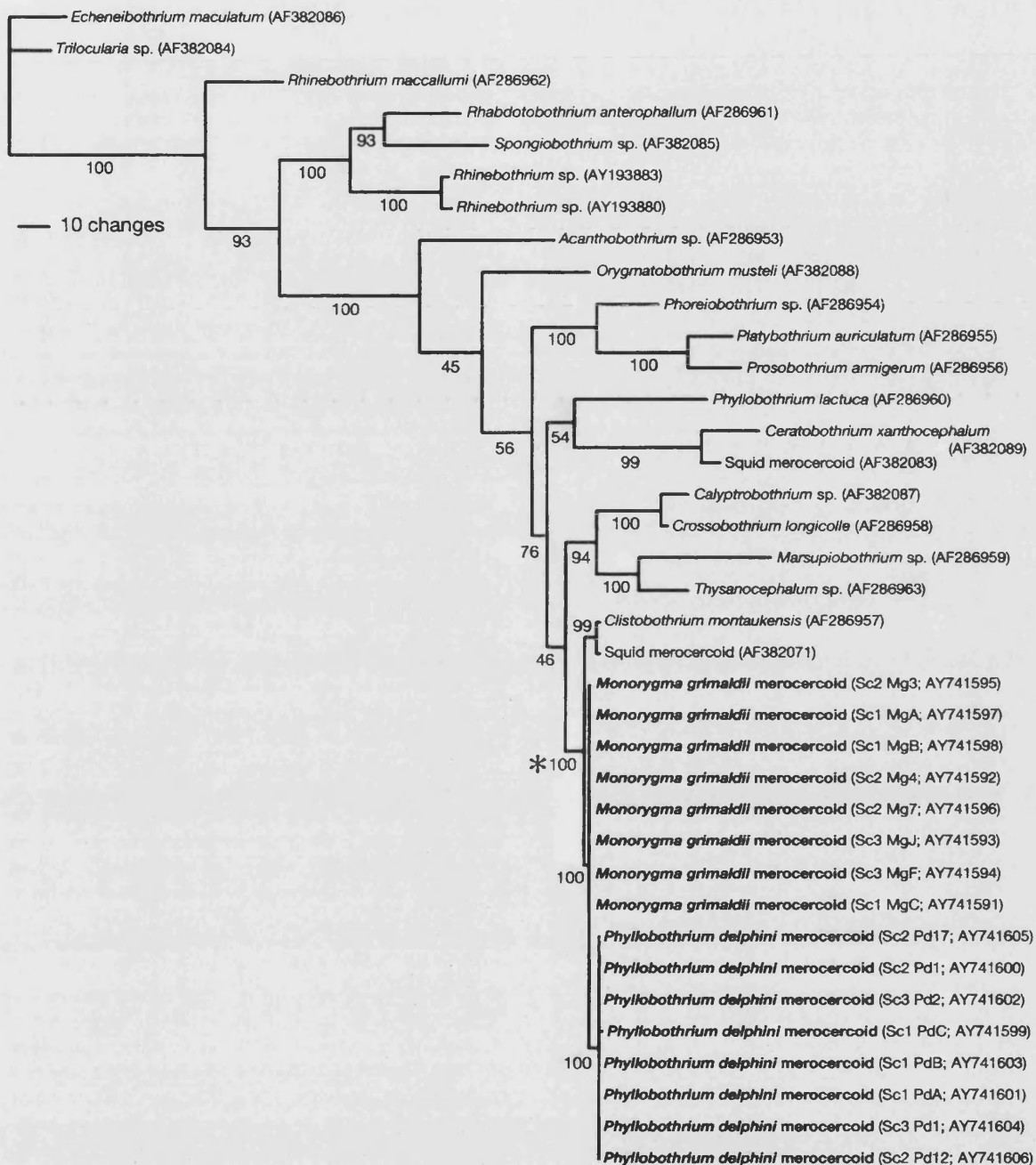


Fig. 5. Results of Bayesian analysis with nodal support shown as percentage posterior probabilities; N.B. branch lengths are proportional to observed character change, not as estimated by Bayesian analysis. Re-alignment and direct comparison of genetic distances were compared for the taxa inclusive of the clade indicated by an asterisk (see text). GenBank sequence Accession numbers shown parenthetically.

Skrjabin, 1970, 1972; Testa & Dailey, 1977; Mendonça, 1984; Raga, 1985; Balbuena, 1991; Siquier & Le Bas, 2003). In specimens of *P. delphini*, Johnston & Mawson (1939) described this organ as an apical plug. In our specimens, the apical organ always appeared as a sac-like structure delimited by a thin muscular membrane. However, we found structural variability even in specimens from the same individual dolphin; in some individuals, the apical organ

resembled a collapsed cup, whereas in others it was dome-shaped. Although the causes of this variability are unclear, Hamilton & Byram (1974) described the *in vitro* development of plerocercoids of the onchobothriid *Acanthobothrium* sp. and found substantial changes in the structure of the apical sucker that are relevant for our case (see also Chambers, Cribb & Jones, 2000): in early development, a typical sucker (i.e. a cup-shaped structure with radial

musculature) was observed. Later on, the apical sucker began to degenerate, and subsequently collapsed and lost the radial muscles. Then, the degenerated sucker everted, acquiring a dome-shape appearance. Finally, the sucker detached from the scolex. The entire process was observed to occur at the larval stage since it was not accompanied by proglottization and sexual differentiation of worms (Hamilton & Byram, 1974). Accordingly, there is the possibility that the variability observed in the apical organ of *P. delphini* and *M. grimaldii* may result from a similar degenerative process (compare Figs 2E, F, H and 4C, F, H with Figs 8–12 in Hamilton & Byram, 1974). In fact, several authors (Southwell & Walker, 1936; Wardle & McLeod, 1952) suggested that the apical sucker of *P. delphini* disappears during development. It is therefore possible that the specimens described as having an apical sucker were in an early stage of development, while the specimens we have described were in intermediate phases of development.

Our re-descriptions of *P. delphini* and *M. grimaldii* provide the most complete account of morphometric data of these larvae to date and illustrate the range of morphological variation in specimens collected from one host species in a single locality. Minor differences of both *P. delphini* and *M. grimaldii* were found with respect to published data, but the ranges of morphometric variables generally overlapped. Moreover, part of the morphometric variability observed could be attributable to differences in the processing methods (see references in Table 1 and 2), or the degree of development of the larvae (Siquier & Le Bas, 2003).

Although diagnosing species via molecular analysis is still at an early stage, it is reasonable to expect that the low variation (<0.5%) observed within the samples of *P. delphini* may be well within the genetic variation of a single morphological species (see, e.g. Brickley *et al.* 2001), and may thus represent population-level differences. Based on previous descriptions and their own morphological data, Testa & Dailey (1977) defined 11 morphotypes of *P. delphini* that were suggested to represent different species (see also Dailey, 1985); up to 6 morphotypes were found in a single host species in the same locality. A cursory examination of samples of *P. delphini* from Mediterranean striped dolphins suggested the presence of at least 4 of the morphotypes described by Testa & Dailey (1977), yet genetic data point to the existence of only 2 genetic signatures that differ by a single base. It is likely therefore that the morphological variation reported by early authors (Guiart, 1935; Delyamure, 1955) and by Testa & Dailey (1977) may be intraspecific, at least in part, and perhaps associated with ontogenetic changes (see Siquier & Le Bas, 2003).

The names *Phyllobothrium delphini* and *Mono-rygma grimaldii* have been used historically

as convenient labels to recognize the 2 types of merocercoids commonly found in marine mammals; however, the taxonomic validity of these names is questionable. Apparently, neither *P. delphini* nor *M. grimaldii* fulfill the current diagnosis of their putative genera (see Ruhnke, 1996 and Euzet, 1994, respectively). Obviously, the problem is that the generic concepts of tetraphyllideans are based on adults, so the use of diagnostic criteria for *P. delphini* and *M. grimaldii* can be justified only if their scolex is not modified through development to the adult stage. At present, we can state only that the scolex morphology of proglottized specimens of *P. delphini* does not differ substantially compared to that of non-proglottized specimens. Therefore, a molecular analysis is fundamental to positively match these larval forms with adult specimens of '*P. delphini*' and '*M. grimaldii*'.

Bayesian analysis indicated that both types of merocercoids cluster together with adult specimens of *C. montaukensis* collected from sharks off the Western Atlantic coast of Montauk, New York, and with some metacestodes collected from squid in the Falkland Islands (Brickley *et al.* 2001); all these taxa are separated by slight genetic distances. Bayesian analysis also indicated that *P. delphini* is far separated from *Phyllobothrium lactuca* van Beneden, 1849, the type species of the genus *Phyllobothrium* van Beneden, 1849. These results have 2 interesting taxonomic implications. First, the analysis suggests that *P. delphini* should be removed from the genus *Phyllobothrium*. Second, it is premature to determine whether the low degree of genetic divergence observed in the clade containing *P. delphini*, *M. grimaldii*, *C. montaukensis* and the squid metacestode represent population, strain or species-level differences but, based on the levels of inter-generic genetic distances as evident in Fig. 5, it might be reasonable to assume that all of these taxa are congeneric. In the case of *P. delphini*, this suggestion seems to be supported by morphological data. If we assume that the structure of the scolex of proglottized specimens of *P. delphini* does not change substantially in the definitive host (see Freeman, 1973), the morphology of the scolex would fit with the description given by Ruhnke (1993) in the generic diagnosis of *Clistobothrium* Dailey & Vogelbein, 1990: 'scolex with 2 dorsal and 2 ventral pedunculate bothridia and dome-shaped or cruciform apical region. Myzorhynchus absent. Each bothridium with single apical, muscular, round sucker. Posterior loculus foliose or folding flap of tissue'. Thus, the only difference between *P. delphini* and the adult of species of *Clistobothrium* is that the latter lacks an apical organ. However, we have suggested above that the apical organ degenerates during the larval development and may disappear at the adult stage. Our taxonomic suggestion agrees with the opinions of several authors (Southwell & Walker, 1936; Johnston & Mawson, 1939; Wardle &

McLeod, 1952), who speculated that *P. delphini* might actually be *Clistobothrium tumidum* (Linton, 1922) Ruhnke, 1993 (syn. *Phyllobothrium tumidum*) based on the morphological resemblance of the scolex. Our taxonomic suggestion is also compatible with ecological data. The 3 known species of *Clistobothrium* are restricted to large pelagic sharks of the family Lamnidae (mackerel sharks) that are known to feed on cetaceans and pinnipeds, as well as on cephalopods (Linton, 1922; Dailey & Vogelbein, 1990; Ruhnke, 1993). In addition, species of *Clistobothrium* have been reported in localities of the Pacific, the Atlantic and the Mediterranean basins (Linton, 1922; Euzet, 1959; Dailey & Vogelbein, 1990; Ruhnke, 1993), where *P. delphini* and *M. grimaldii* are also known to occur (see Raga, 1994, and references therein).

The generic assignation of *M. grimaldii* is much more problematic. The scolex morphology of these merocercoids is very different from that of *P. delphini* and that of *Clistobothrium* (the scolex morphology of squid metacercariae from Falkland Island has not been described, see Brickley *et al.* (2001)). We were unable to find proglottized specimens of *M. grimaldii*, so we ignore whether there might be substantial changes in scolex morphology when merocercoids begin proglottization. However, according to the slight differences observed between non-proglottized and proglottized specimens of *P. delphini*, we should not expect deep transformations in proglottized *M. grimaldii*.

In summary, our study provides, for the first time, a detailed morphological analysis of *P. delphini* and *M. grimaldii*, and a description of proglottized specimens of *P. delphini*. We also provide the first molecular analysis of the 2 larval types, which reveals that little variability exists within each type, and that both types might be congeneric with *C. montaukensis*. This suggestion is supported by morphological and ecological data in the case of *P. delphini*, but not in the case of *M. grimaldii*. The lack of congruence between molecular and morphological analyses will be solved definitively when a complete phylogenetic tree of the Tetraphyllidea, as well as molecular data from adult forms of Mediterranean species of tetraphyllideans, are available.

We thank our colleagues from the Marine Zoology Unit, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (University of Valencia), for their assistance with the necropsies of animals, to the staff of the Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental of the University of Valencia for their technical assistance with the SEM and ESEM, and to Dr J. Pertusa (University of Valencia) for his assistance with the histological techniques. Thanks are also due to Dr B. B. Georgiev (Bulgarian Academy of Sciences) for his comments and assistance. The comments of two anonymous referees are highly appreciated. Cetaceans were collected thanks to an agreement between the Conselleria de Medio Ambiente (Generalitat Valenciana) and the University of Valencia. This work has

been supported by projects BOS2002-00878 and REN2003-01758 from the Spanish Government and by project GV04B-304 from the Valencian Government. P.D.O. and D.T.J.L. were supported by a Wellcome Trust Senior Fellowship to D.T.J.L. (043965/Z/95/Z). F.J.A. benefits from a 'Ramón y Cajal' contract from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain. The first author holds a doctoral fellowship from the Conselleria de Cultura, Educación y Ciencia of the Generalitat Valenciana.

REFERENCES

- BAER, J. G. (1932). Contribution à l'étude des Cestodes de Cétacés. *Revue Suisse de Zoologie* **39**, 195–228.
- BALBUENA, J. A. (1991). *Estudio taxonómico y ecológico de la parasitofauna del calderón común*, Globicephala melas (Traill, 1809), en las aguas de Europa. Ph.D. thesis, University of Valencia.
- BESTER, M. N. (1989). Endoparasites of the subantarctic fur seal *Arctocephalus tropicalis* from Gough Island. *South African Journal of Zoology* **24**, 363–365.
- BRICKLEY, P., OLSON, P. D., LITTLEWOOD, D. T. J., BISHOP, A. & ARKHIPKIN, A. I. (2001). Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Canadian Journal of Zoology* **79**, 2289–2296.
- CAIRA, J. N., JENSEN, K. & HEALY, C. J. (1999). On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Systematic Parasitology* **42**, 77–151.
- CHAMBERS, C. B., CRIBB, T. H. & JONES, M. K. (2000). Tetraphyllidean metacercariae of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of *in vitro* cultivation to identify them. *Folia Parasitologica* **47**, 285–292.
- CHERVY, L. (2002). The terminology of larval cestodes or metacercariae. *Systematic Parasitology* **52**, 1–33.
- DAILEY, M. D. (1985). Diseases of Mammalia: Cetacea. In *Diseases of Marine Animals* (ed. Kinne, O.). Vol. IV, Part 2, pp. 805–847. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- DAILEY, M. D. & BROWNELL, R. L. (1972). A checklist of marine mammal parasites. In *Mammals of the Sea. Biology and Medicine* (ed. Ridgway, S. H.), pp. 528–589. C.C. Thomas Publisher, USA.
- DAILEY, M. D. & VOGELBEIN, W. (1990). *Clistobothrium carcharodon* gen. et sp. n. (Cestoda: Tetraphyllidea) from the spiral valve of the great white shark (*Carcharodon carcharias*). *Journal of the Helminthological Society of Washington* **57**, 108–112.
- DELYAMURE, S. L. (1955). *Helminth Fauna of Marine Mammals (Ecology and Phylogeny)*. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, Russia. (English translation by M. Raveh, 1968. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel.)
- DOLLFUS, R. P. H. (1964). A propos de la récolte, à Banyuls d'un cystique de Cestode chez *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Les cystiques des cestodes chez les cétacés et pinnipèdes. *Vie Milieu* **17**, 177–204.
- EUZET, L. (1959). *Recherches sur les cestodes tétraphyllides des séliaciens des côtes de France*. Ph.D. thesis, University of Montpellier.
- EUZET, L. (1994). Order Tetraphyllidea Carus, 1863. In *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates* (ed. Khalil,

- L. F., Jones, A. & Bray, R. A.), pp. 149–194. Wallingford: CAB International.
- FREEMAN, R. S. (1973). Ontogeny of cestodes and its bearing on their phylogeny and systematics. *Advances in Parasitology* **11**, 401–557.
- GARIPPA, G., SCALA, A. & PAIS, A. (1991). *Phyllobothrium delphini* and *Pennella* sp. in a dolphin of the species *Stenella coeruleoalba*. *Bollettino della Società Italiana di Patologia Ittica* **6**, 19–24.
- GUIART, M. J. (1935). Cestodes parasites provenant des campagnes scientifiques du Prince Albert 1^{er} de Monaco. *Résultats des Campagnes Scientifiques du Prince de Monaco, Monaco* **91**, 1–105.
- HAMILTON, K. A. & BYRAM, J. E. (1974). Tapeworm development: the effects of urea on a larval tetraphyllidean. *Journal of Parasitology* **60**, 20–28.
- HUELSENBECK, R. & RONQUIST, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- JOHNSTON, T. H. & MAWSON, P. M. (1939). Internal parasites of the pigmy sperm whale. *Records of the South Australian Museum* **6**, 263–274.
- LINTON, E. (1905). Notes on cestode cyst, *Taenia chamissonii*, new species, from a porpoise. *Proceedings of the United States National Museum* **28**, 819–823.
- LINTON, E. (1922). A new cestode from the manatee and mackerel sharks. *Proceedings of the United States National Museum* **61**, 1–16.
- MADDISON, D. R. & MADDISON, W. P. (2000). *MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Version 4.06. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- MARKOWSKI, S. (1955). Cestodes of whales and dolphins from the Discovery Collections. *Discovery Reports* **27**, 377–395.
- MENDONÇA, M. M. (1984). *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) (Cestoda, Tetraphyllidae) from *Arctocephalus pusillus* (Schreber, 1778) (Carnivora, Otariidae) in captivity. *Revista Iberica de Parasitologia* **44**, 39–44.
- NYLANDER, J. (2002). *MrModeltest Version 1.1b*. Department of Systematic Zoology, EBC, Uppsala, Sweden.
- OLSON, P. D., LITTLEWOOD, D. T. J., BRAY, R. A. & MARIAUX, J. (2001). Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 443–467.
- OLSON, P. D., CRIBB, T. H., TKACH, V. V., BRAY, R. A. & LITTLEWOOD, D. T. J. (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* **33**, 733–755.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817–818.
- RAGA, J. A. (1985). *Contribución al estudio del parasitismo y demás asociaciones en los cetáceos de la Península Ibérica*. Ph.D. thesis, University of Valencia.
- RAGA, J. A. (1994). Parasitismus bei den Cetacea. In *Handbuch der Säugetiere Europas* (ed. Robineau, D., Duguy, R. & Klima, M.). Band 6/I A Meeressäuger, Teil I A: Wale und Delphine 1, pp. 132–179. Aula-Verlag Wiesbaden.
- REYDA, F. & OLSON, P. D. (2003). Cestodes of Peruvian freshwater stingrays. *Journal of Parasitology* **89**, 1018–1024.
- RUHNKE, T. R. (1993). A new species of *Clistobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidae), with an evaluation of the systematic status of the genus. *Journal of Parasitology* **79**, 37–43.
- RUHNKE, T. R. (1996). Taxonomic resolution of *Phyllobothrium* van Beneden (Cestoda: Tetraphyllidae) and a description of a new species from the leopard shark *Triakis semifasciata*. *Systematic Parasitology* **33**, 1–12.
- SIQUIER, G. F. & LE BAS, A. E. (2003). Morphometrical categorization of *Phyllobothrium delphini* (Cestoidea, Tetraphyllidae) cysts from Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei* (Cetacea, Delphinidae). *Latin American Journal of Aquatic Mammals* **2**, 95–100.
- SKRJABIN, A. S. (1964). [Helminth larval forms of marine mammals from Far East seas]. In *Morskije Mlekopitayushchie*, pp. 311–316. Moscow: Nauka [in Russian].
- SKRJABIN, A. S. (1970). The first finding of larvae of the cestode *Monorygma delphini* (Tetraphyllidae, Phyllobothriidae) in Antarctic whales. *Zoologicheskii Zhurnal* **49**, 1721–1722 [in Russian].
- SKRJABIN, A. S. (1972). Larvae of cestodes of the genus *Phyllobothrium* Beneden, 1850 (Tetraphyllidae), parasites of whales and other marine animals. *Parazitologiya* **6**, 426–434 [in Russian].
- SOULIER, L. (1993). *Contribution à l'étude de la faune parasitaire des cétacés*. Ph.D. thesis, Université Claude Bernard de Lyon.
- SOUTHWELL, T. & WALKER, A. J. (1936). Notes on a larval cestode from a fur seal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **30**, 91–100.
- SWOFFORD, D. L. (2001). *Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other Methods)*. Vers. 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- TESTA, J. & DAILEY, M. D. (1977). Five new morphotypes of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Tetraphyllidae), their relationship to existing morphotypes, and their zoogeography. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* **76**, 99–110.
- WALKER, W. A. (2001). Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the Northern North Pacific, Bering Sea and Sea of Okhotsk. *Marine Mammal Science* **17**, 264–275.
- WARDLE, R. A. & McLEOD, J. A. (1952). *The Zoology of Tapeworms*. University of Minnesota Press, Minneapolis.

**4.3. MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES
FROM WESTERN MEDITERRANEAN STRIPED DOLPHINS
(*STENELLA COERULEOALBA*).**

Microtriches of Tetraphyllidean Metacestodes From Western Mediterranean Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*)

Celia Agustí,* Francisco Javier Aznar, and Juan Antonio Raga

Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, 46071 Valencia, Spain

ABSTRACT The tegumental structures of two types of tetraphyllidean plerocercoids and two types of merocercoids (*Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*) from Mediterranean striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, are described for the first time using scanning electron microscopy. The tegument of all of the specimens was fully covered with microtriches. Four basic types were found: filitriches, blade-like spinitriches of different sizes and shapes, cone-shaped spinitriches (with two parallel small projections of equal length at the apex), and crowned cylindrical spinitriches (with 6–7 small papillae forming a crown at the apex); the two latter types are newly described. The two types of plerocercoids had a similar morphology and distribution of microtriches; in addition, cilium-like projections appeared interspersed among the microtriches on the apical sucker, accessory suckers, and distal bothridial locus. Merocercoids exhibited a greater variety of tegumental structures, especially on the distal bothridial locus. Both merocercoid types had regularly spaced papillae or “buttons” on the accessory suckers and the distal bothridial locus that were composed of a central cilium-like projection surrounded by numerous filitriches. However, crowned cylindrical spinitriches were specific to *P. delphini* and cone-shaped spinitriches were specific to *M. grimaldii*. Differences in the morphology and distribution of scolex microtriches of adult cestodes have been considered useful for species identification. A previous molecular study has suggested that *P. delphini* and *M. grimaldii* are actually different congeneric species. Our study has shown that significant differences in the morphology and distribution of microtriches occur between these species at the merocercoid stage. *J. Morphol.* 265:176–189, 2005.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Tetraphyllidea; plerocercoid; *Phyllobothrium delphini*; *Monorygma grimaldii*; microtriches; Cetea; tegument; SEM

The tegument of both larval and adult cestodes exhibits characteristic structures that appear to be involved in functions such as absorption, attachment, protection, and sensory reception (Andersen, 1975; Lumsden, 1975; Thompson et al., 1980; Palm et al., 1998). Among them, microtriches are the hallmark feature of the tapeworm tegument (Coil, 1991). Recent studies have shown that microtrich

patterns in adult forms provide valuable data for the differentiation of species (Caira, 1992; Ruhnke, 1994, 1996; Tyler and Caira, 1999; Caira and Tracy, 2002). However, information on the tegumental structures of tetraphyllidean metacestodes (the terminology for the larval cestodes follows Chervy, 2002) is rather scarce. Gabrion and Euzet-Sicard (1979) and Khalil (1995) described the morphology of several tegumental structures on the surface of unidentified tetraphyllidean plerocercoids from Mediterranean teleosts, but did not provide detailed information on the patterns of microtrich distribution. In the most detailed study to date, Caira and Ruhnke (1991) described the microtriches found on the scolex of plerocercoids and adults of the onchobothriid *Calliobothrium verticillatum* and revealed ontogenetic changes in the morphology and distribution of microtriches.

In the last two centuries, several types of tetraphyllidean metacestodes have been reported in marine mammals worldwide (Delyamure, 1955; Dailey and Brownell, 1972; Dailey, 1985; Bester, 1989; Raga, 1994; Agustí et al., 2005a,b). However, their taxonomic identity still remains unknown. Morphologically, four types have been recognized. Two encysted forms (merocercoids), i.e., *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*, occur in the subcutaneous blubber and peritoneum of the abdominal cavity, respectively. Two mobile forms (plerocercoids), tentatively named “small” and “large” (Agustí et al., 2005a), occur in the digestive system: the

Contract grant sponsor: the Spanish Government; Contract grant numbers: BOS2002-00878, REN2003-01758 (FEDER); Contract grant sponsor: the Valencian Government; Contract grant number: GV04B-304; Contract grant sponsor: the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain, “Ramón y Cajal” contract (to F.J.A.).

*Correspondence to: Celia Agustí, Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, P.O. Box 22085, 46071 Valencia, Spain.
E-mail: celia.agusti@uv.es

Published online 15 June 2005 in
Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)
DOI: 10.1002/jmor.10349

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

177

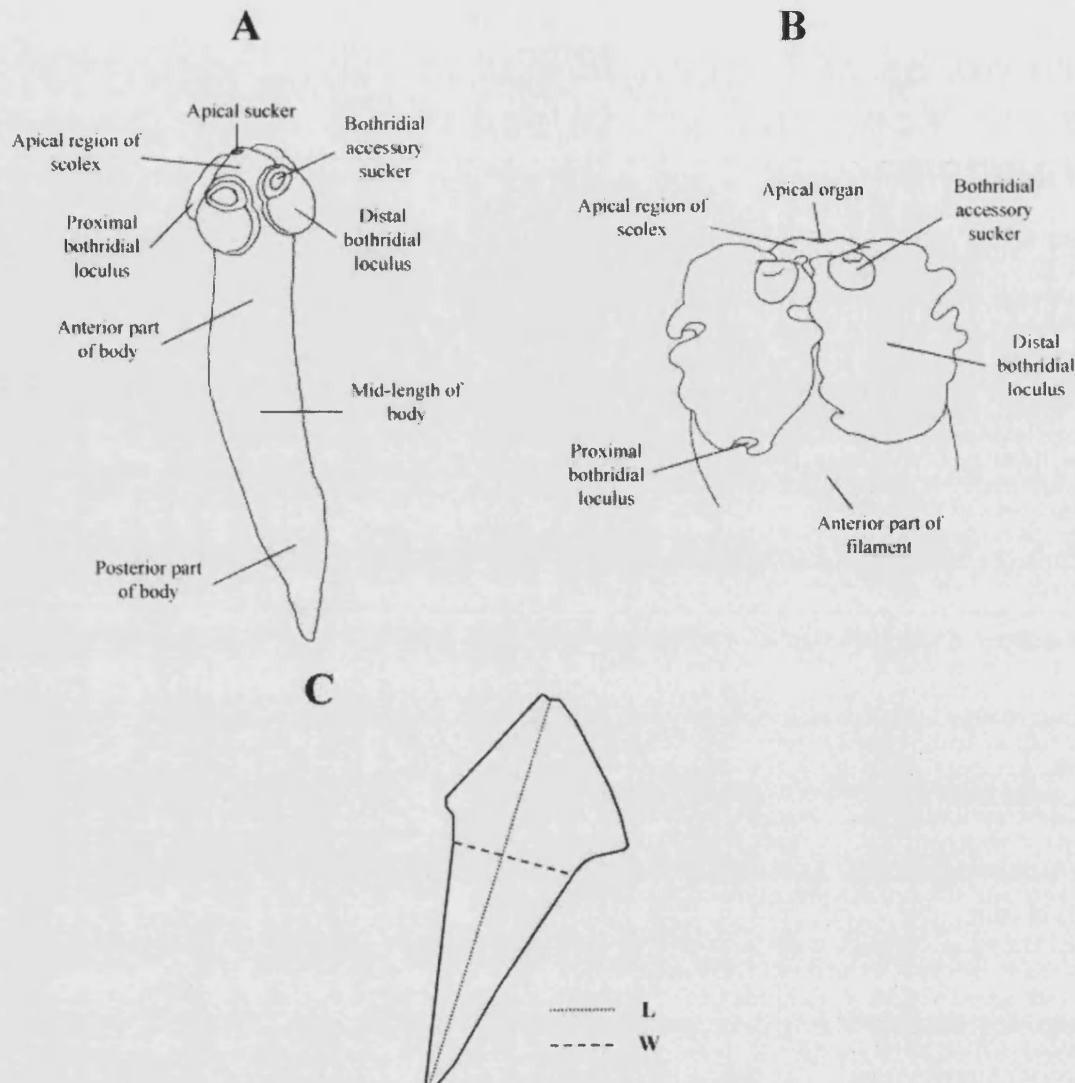


Fig. 1. Diagrammatic drawings of the regions examined in order to describe the tegumental structures. **A:** Plerocercoids. **B:** Mero-cercoids. **C:** Microthrix showing measurements taken. L, total length; W, width.

“small” type preferentially in the mucous layer of the terminal colon and rectum, and the “large” type inside anal crypts and free in hepatic and pancreatic ducts.

During the parasitological examination of striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, stranded on the Mediterranean coast of Spain, we had the opportunity to collect a number of live specimens belonging to the four larval types described above (Agustí et al., 2005a,b). In this study we provide a thorough scanning electron microscopical (SEM) description of the morphology and distribution patterns of microtriches and other structures found on the tegument of these specimens, discussing some functional and taxonomic implications.

MATERIALS AND METHODS

Material for this study comes from a parasitological survey carried out on striped dolphins, *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), from off the Mediterranean coast of Spain (Agustí et al., 2005a,b). Seven striped dolphins (two males, range of total length: 168–184 cm; five females, range of total length: 106–211 cm), stranded dead between 40°13'N, 0°17'E and 37°52'N, 0°45'W, were selected for this study because they were in good condition (codes 2–3 *sensu* Geraci and Lounsbury, 1993). Six specimens of the “small” plerocercoid type from the terminal colon and rectum (range of total length: 278–465 μ m; mean \pm SD: 356 \pm 84), six specimens of the “large” plerocercoid type from anal crypts (1,111–1,890; 1,443 \pm 345), four specimens of the “large” plerocercoid type from the hepatic and pancreatic ducts (1,313–3,973; 2,461 \pm 1,160), five mero-cercoids of *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) van Beneden, 1868, from subcutaneous blubber, and five mero-cercoids of *Monorygma grimaldii* (Moniez,

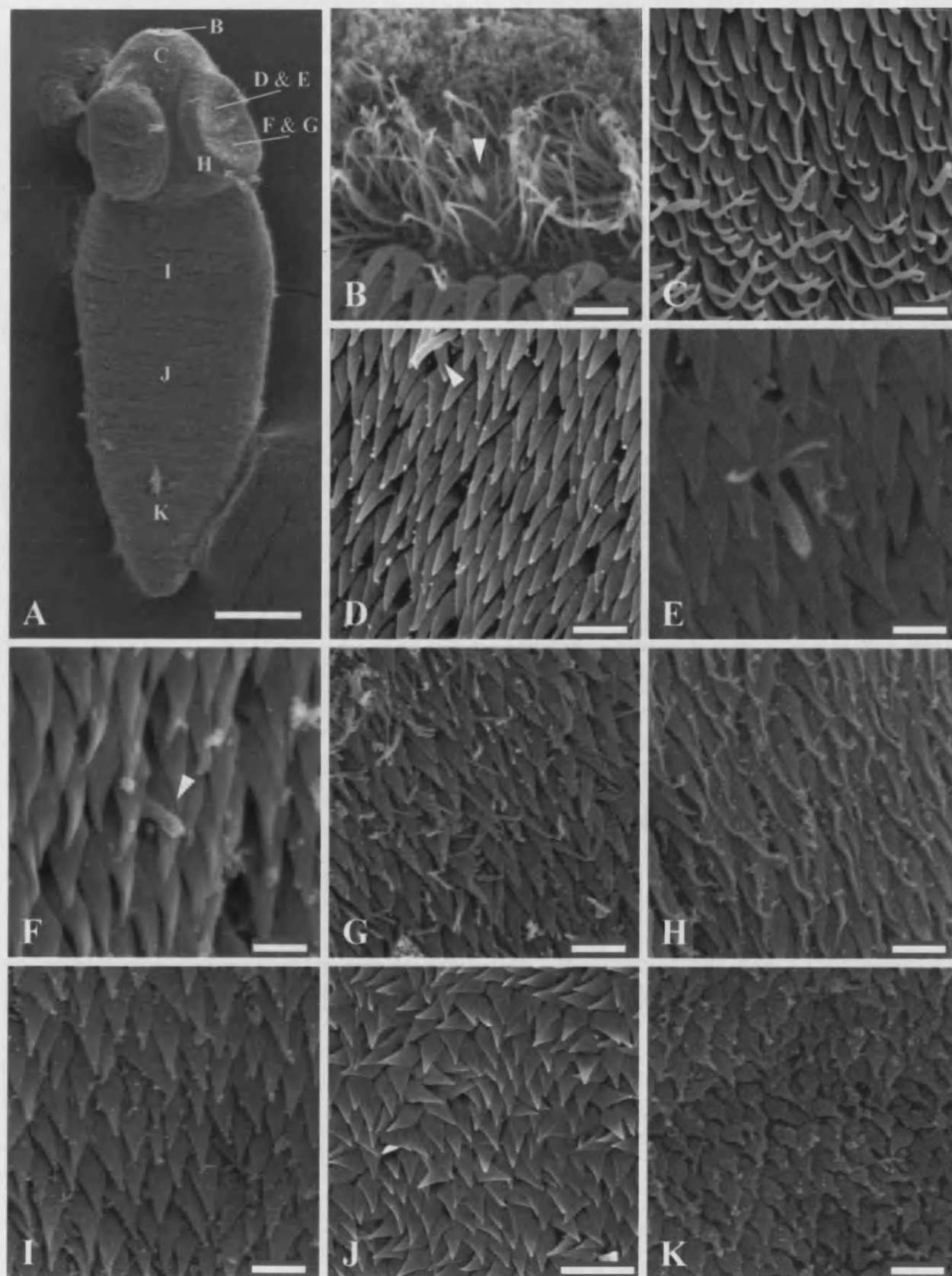


Figure 2

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

179

1889) Baylis, 1919, from the abdominal peritoneum, were collected live. All metacestodes were washed in saline and the scolices of the encysted forms were evaginated as follows: the cysts were opened, the entire filaments and invaginated scolices were removed from the cysts, and filaments were cut near the scolices and left in saline until the scolices were fully evaginated. Live specimens or scolices were fixed in a hot solution of 10% (v/v) formalin in Sørensen's phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), dehydrated in an ethanol series, critical point-dried in liquid CO₂, mounted on specimen stubs using conductive carbon paint, sputter-coated with gold-palladium to a thickness of 25–30 nm in a BioRad (Hercules, CA) Sc 500 coating unit, and examined in a S-4100 SEM at 5–10 kV.

According to indications by Caira et al. (1999) and our own observations, the following regions of the scolex were examined to describe patterns of microthrix distribution (Fig. 1A,B): the apical sucker (in the case of the plerocercoids) or the apical organ (in the case of the merocercoids); the apical region of the scolex (equivalent to the "apical modification of the scolex proper" in the case of merocercoids; see Agustí et al., 2005b); the adherent surface of the bothridial accessory suckers; the proximal surface of the bothridial locus (nonadherent surface); and the distal surface of the bothridial locus (adherent surface). In addition, the following regions of the body were examined: in the case of the plerocercoids, three points along the body length, i.e., anterior, mid-length, and posterior; in the case of the merocercoids, the anterior part of the filament that connects the scolex with the bladder.

The high density and overlapping of microtriches in most regions precluded observations on their entire length. Since we were unable to observe the base of most microtriches, measurements are generally approximate (total length was considered as the distance between the presumed basal region to the tip; the width was taken at the broadest point). When the entire length could be seen, measurements were taken as shown in Figure 1C to make them comparable with those of overlapping microtriches. Measurements are given in nanometers unless otherwise stated.

The terminology of microthrix morphology follows Caira et al. (1999) and Faliex et al. (2000), except for the types that have not been previously described.

RESULTS

Among specimens of the same larval type, we observed no significant differences in either the morphology and arrangement of microtriches within each region examined or the pattern of microthrix distribution among specimens. Only small differences were noticed in some areas of several specimens of the four larval types (see below).

Fig. 2. "Small" plerocercoids from Mediterranean striped dolphins. SEM. A: Entire specimen. The letters correspond to the micrographs of each region as follows. B: Filitrices and a cilium-like projection (arrowhead) on apical sucker. C: Slender blade-like spinitriches on the apical region of the scolex. D: Blade-like spinitriches and a cilium-like projection (arrowhead) on the bothridial accessory sucker. E: Blade-like spinitriches and a cilium-like projection surrounded by filitrices on the bothridial accessory sucker. F: Blade-like spinitriches and a cilium-like projection (arrowhead) on the distal bothridial locus. G: Blade-like spinitriches interspersed with small blade-like spinitriches with a thin filiform tip (some of them could be filitrices) on the distal bothridial locus. H: Slender blade-like spinitriches on the proximal bothridium. I: Blade-like spinitriches on the anterior body. J: Blade-like spinitriches on the midbody. K: Blade-like spinitriches on the posterior body. Scale bars in A = 50 µm; in B,C,D,G-I,K = 1,000 nm; in E,F = 500 nm; in J = 2.5 µm.

Microthrix Types

Our study revealed two basic microthrix types, filiform and spiniform, the latter being represented by three subtypes.

Filitrices (filiform microtriches) (e.g., Fig. 4B) are typically tubular or cylindrical with a blunt distal tip; their size varies from relatively short to highly elongate, ~0.1 µm in diameter.

Spinitrices (spiniform microtriches) are more robust than filitrices, have a broad base, and can vary substantially in shape. Three types of spinitrices were found in this study:

Blade-like spinitrices (e.g., Fig. 2D): Flattened microtriches with the base broader than the apex. When the entire microthrix can be observed it has a spearhead shape (Fig. 2J). A wide variability in the size and shape of the blade-like spinitrices was observed: some have a blunt apex (resembling a blade of grass), whereas others possess a long filiform tip of variable length (Fig. 3G). When the base of the microthrix cannot be seen, it is very difficult to distinguish blade-like spinitrices with long filiform tip from filitrices (Fig. 2G).

Crowned cylindrical spinitrices (new microthrix type, see Fig. 4G,H): Tube-shaped microtriches with a spherical base and 6–7 small papillae forming a crown at the apex.

Cone-shaped spinitrices (new microthrix type, see Fig. 5G): Cone-shaped microtriches with a broad circular base and two small parallel projections of equal length at the apex.

Patterns of Microthrix Distribution

"Small" type (Fig. 2; Table 1) and "large" type (Fig. 3; Table 1) plerocercoids. The apical sucker of the scolex is covered with filitrices (Figs. 2B, 3B). The apical region of the scolex, bothridial accessory suckers, and distal and proximal bothridial locus bear blade-like spinitrices (Figs. 2C,D,F,H, 3C,G,H); those from the apical region and proximal bothridium are comparatively more slender (Figs. 2C,H, 3C,H). In all specimens of the "large" plerocercoid type, and some of the "small" type, the apical region, accessory suckers, and distal surface of the bothridial locus are covered with blade-like spinitrices with a blunt apex interspersed by blade-like spinitrices with a thin filiform tip of variable length (Figs. 2G, 3G). The latter are clearly identifiable only when the base is visible; otherwise, they cannot be distinguished from long filitrices. In some areas devoid of blade-like spinitrices only short filitrices were found (Fig. 3F). Microtriches on the scolex are oriented posteriorly in all plerocercoids. The body surface is covered with blade-like spinitrices in both plerocercoid types (Figs. 2I–K, 3I–K). However, some differences in the size and arrangement were observed. Microtriches decreased in size from the anterior to the posterior regions of

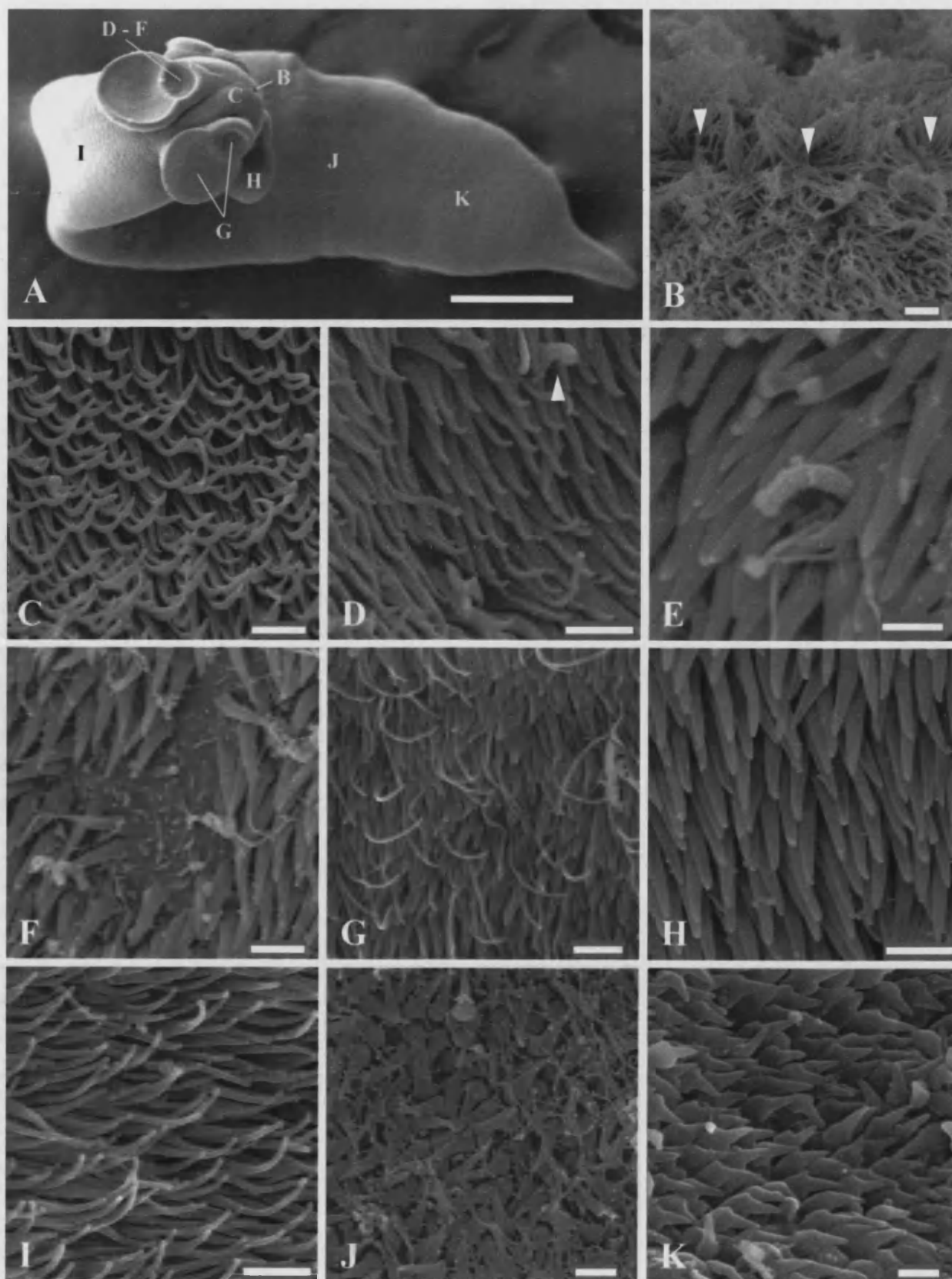


Figure 3

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

181

the body (see Table 1). In most plerocercoids of both types the majority of microtriches are oriented posteriorly and some laterally (Fig. 2J). However, in two specimens of the "small" type, two specimens of the "large" type from the anus, and one specimen of the "large" type from the liver the microtriches exhibited a multidirectional orientation in some body regions (Fig. 3J).

Phyllobothrium delphini (Fig. 4; Table 3). The apical organ is covered with filitriches (Fig. 4B). The surface of the apical region of the scolex bears very slender blade-like spinitriches (in lateral view they resemble filitriches) oriented posteriorly (Fig. 4C); in one case, a small area of this region was devoid of blade-like spinitriches and only short filitriches were found (Fig. 4D). The bothridial accessory suckers are covered with blade-like spinitriches oriented in a posterolateral direction. In some specimens the blade-like spinitriches are interspersed with microtriches with the appearance of filitriches (the base could not be seen) (Fig. 4E). The distal surface of the bothridial loculus is covered by crowned cylindrical spinitriches interspersed with filitriches (Fig. 4G,H); both types are oriented orthogonally to the surface of the bothridial loculus. The proximal surface of the bothridial loculus bears slender blade-like spinitriches oriented towards the margin of the bothridium (Fig. 4K). The anterior part of the filament is densely covered with filitriches (Fig. 4L).

Monorygma grimaldii (Fig. 5; Table 3). The apical organ is covered with filitriches (Fig. 5B). The surface of the apical region of the scolex bears broad-based blade-like spinitriches interspersed with filitriches; both types of microtriches are oriented posteriorly (Fig. 5C). The bothridial accessory suckers bear blade-like spinitriches oriented in a posterolateral direction; in some specimens they are interspersed with microtriches with the appearance of filitriches (the base could not be seen) (Fig. 5D). The distal surface of the bothridial loculus is covered with cone-shaped spinitriches interspersed with filitriches; both types are oriented orthogonally to the surface of the bothridial loculus (Fig. 5G). The proximal surface of the bothridial loculus bears slender

blade-like spinitriches oriented posteriorly (Fig. 5I). The anterior part of the filament is densely covered with filitriches (Fig. 5J).

Other tegumental structures (Figs. 2–5; Tables 2, 4). In "small" and "large" plerocercoids, cilium-like projections appear interspersed among the microtriches on the external margin of the apical sucker and on the entire surface of the bothridial accessory suckers and the distal bothridial loculus (Figs. 2B,D–F, 3B,D,E). These cilium-like projections are cylindrical, with wrinkled surfaces and blunt distal tips. Typically they appear single (Figs. 2F, 3D) but are surrounded by a few (3–4) filitriches in three specimens: i.e., the accessory suckers of one "small" plerocercoid (Fig. 2E); the accessory suckers and distal bothridial loculus of one "large" plerocercoid from the anal canal (Fig. 3E); and the distal bothridial loculus of one "large" plerocercoid from the liver.

At low magnification the entire surface of the bothridial accessory suckers and distal bothridial loculus of both *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii* is covered with regularly spaced dome-shaped structures resembling papillae or "buttons" (Figs. 4I, 5E). At high magnification these "buttons" appear to be composed of a single central cilium-like projection surrounded by numerous filitriches (~30 in *M. grimaldii* and 100 in *P. delphini*) (Figs. 4F,J, 5F,H). As in the case of the plerocercoids, cilium-like projections are cylindrical, with a wrinkled surface and blunt distal tip.

DISCUSSION

This is the first detailed description of the tegumental structures of tetraphyllidean metacestodes from marine mammals. Our study reveals that the entire surface of the four types of metacestode is covered with microtriches. Blade-like spinitriches and filitriches are the types most commonly found in the four metacestode types (Fig. 6); indeed, spinitriches and filitriches are considered symplesiomorphic in the Cestoda and are broadly distributed among species of disparate orders, including the Pseudophyllidea, Cyclophyllidea, Tetraphyllidea, Tetrabothriidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, and Trypanorhyncha (Ruhnke, 1994; Hoberg et al., 1995). However, in merocercoids we found two new types of spinitriches, which appear on the distal surface of the bothridial loculus (Fig. 6).

Microtriches are generally classified according to their morphology, but our study suggests that extreme care is necessary when attempting description and classification. First, in our specimens it was sometimes impossible to describe the actual morphology of some microtriches because of their dense overlap. For instance, unless the base of the microtrich is observed, it is not possible to distinguish a filitrich from a filiform tip of a blade-like spinitrich with a filiform tip. Second, orientation was some-

Fig. 3. "Large" plerocercoids from Mediterranean striped dolphins. SEM. A: Entire specimen. The letters correspond to the micrographs of each region as follows. B: Filitriches and three cilium-like projections (arrowheads) on the apical sucker. C: Slender blade-like spinitriches on the apical region of the scolex. D: Blade-like spinitriches and a cilium-like projection (arrowhead) on a bothridial accessory sucker. E: Blade-like spinitriches and a cilium-like projection surrounded by filitriches on a bothridial accessory sucker. F: Small area of an accessory sucker with short filitriches. G: Blade-like spinitriches with blunt apex interspersed with blade-like spinitriches with a thin filiform tip on accessory suckers and the distal bothridial loculus. H: Slender blade-like spinitriches on the proximal bothridium. I: Blade-like spinitriches on the anterior body. J: Blade-like spinitriches on the midbody. K: Blade-like spinitriches on the posterior body. Scale bars in A = 250 μ m; in B–D,F–J = 1,000 nm; in E,K = 500 nm.

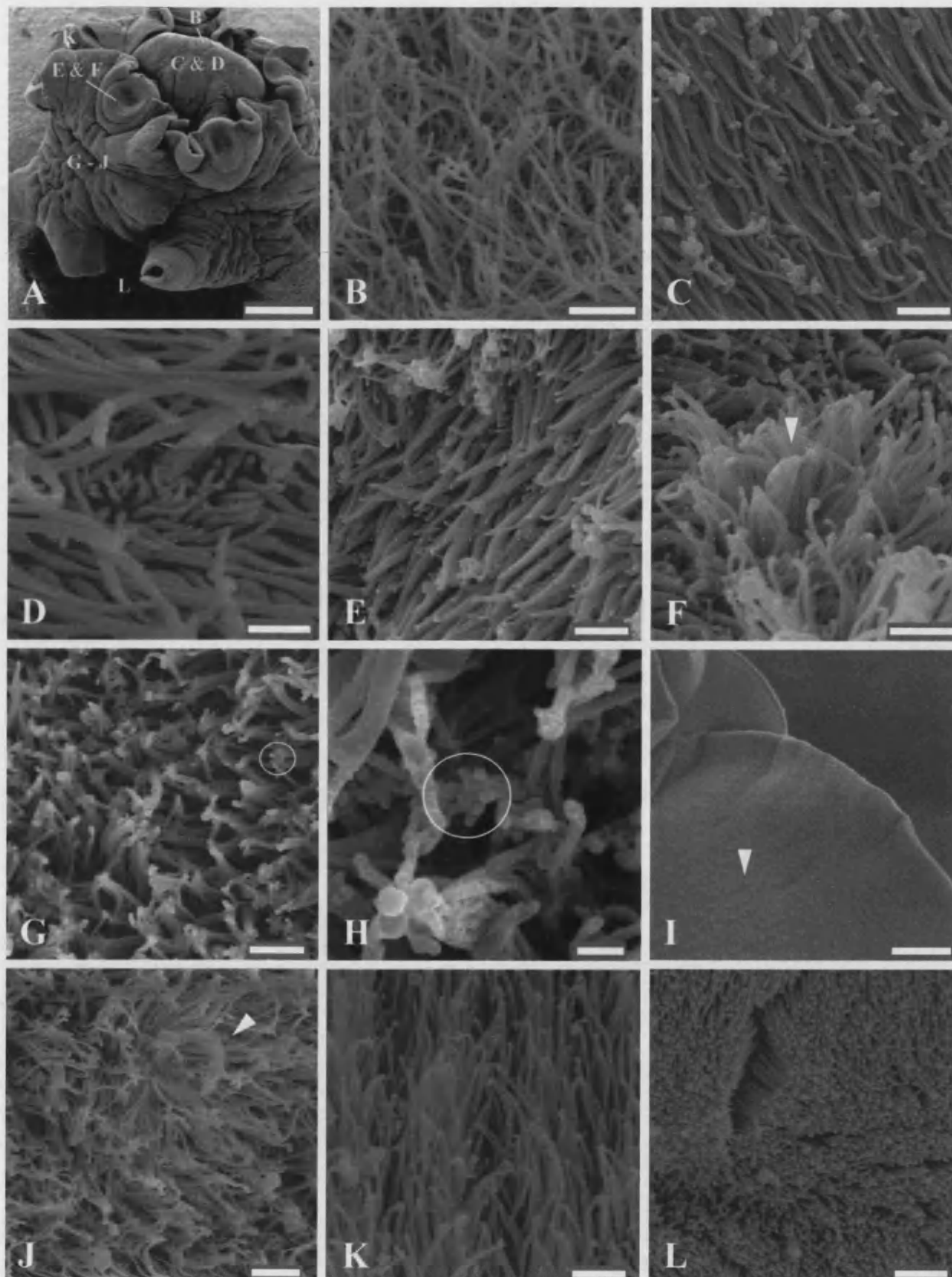


Figure 4

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

183

times fundamental for an accurate description. The very slender blade-like spinitriches of the apical region of *Phyllobothrium delphini* have the appearance of filitriches when they are observed in lateral view and, therefore, different views of the tegumental surface were necessary to describe them properly. Third, morphological appearance strongly depends on the degree of magnification. At low magnification the crowned cylindrical spinitriches on the distal surface of the bothridial loculus of *P. delphini* resembled filitriches, and only with very high magnification ($\sim \times 40,000$) could the crown be discerned. Finally, it is important to bear in mind that the cestode tegument is a dynamic structure (Davydov, 1995; Jones, 1998). We found some spots on the tegument of two metacestode specimens that were devoid of the characteristic blade-like spinitriches of the surrounding region, having instead short filitriches. However, these spots had an irregular shape and occurred in different unpredictable points, suggesting that the tegument was eroded at these points and microtrich regeneration was occurring. If so, these short filitriches might actually be developing blade-like spinitriches. Indeed, Osaki (1990) described similar microtriches on the tegument of plerocercoids of *Spirometra erinacei* after its tegumental structures were peeled off during the penetration of the plerocercoid through the host's intestinal wall. On the other hand, we found microtriches that resemble filitriches interspersed with blade-like spinitriches on some areas of the four larval types; however, we cannot rule out the possibility that these filitriches were actually growing blade-like spinitriches.

Our specimens of "small" and "large" plerocercoid types are generally similar with respect to the morphology and pattern of microtrich distribution (Fig. 6). Similarity also occurs in other tegumental structures; in both types, cilium-like projections appear interspersed among microtriches on several areas of the scolex. As far as is known, other tetraphyllidean

plerocercoids share a similar microtrich morphology and distribution (Gabrion and Euzet-Sicard, 1979; Caira and Ruhnke, 1991; Khalil, 1995), although some differences appear to exist. Caira and Ruhnke (1991) examined several scolex regions in plerocercoids of *Calliobothrium verticillatum* and, unlike our results, they reported no microtriches surrounding the apical sucker. Likewise, Khalil (1995) reported no microtriches on the distal surface of the bothridia in tetraphyllidean plerocercoids of the type *Scolex pleuronectis*. However, the possibility that the absence of microtriches is caused by a loss during the processing of the material cannot be ruled out (see Caira and Ruhnke, 1991). With respect to other tegumental structures, the external morphology of the cilium-like projections of our plerocercoids is very similar to the unciliated sensory receptors found by Gabrion and Euzet-Sicard (1979) on the bothridial surface and the apical sucker of other tetraphyllidean plerocercoids.

There are some similarities and dissimilarities in the morphology and distribution of tegumental structures between the plerocercoids and merocercoids (i.e., *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*) examined in this study (Fig. 6). The morphology of the microtriches on the apical sucker/organ, bothridial accessory suckers, and proximal bothridial loculus is very similar in the four larval types. However, the microtriches on the apical region of scolex, distal surface of the bothridial loculus, and body/filament are rather different. In particular, there is an increase in the diversity of microtrich morphology in the merocercoids. This increase in complexity also affects other tegumental structures, since the cilium-like projections observed in plerocercoids are always surrounded by numerous filitriches in merocercoids; at low magnification the entire structure resembles a "button" or papilla. The tegumental differences between plerocercoids and merocercoids are interesting because, in a recent article (Agustí et al., 2005a), we suggested that the "small" and "large" plerocercoids could be the previous developmental stages of *P. delphini* and *M. grimaldii*. If so, we could view these differences as ontogenetic changes in the tegumental surface. In the only study reporting ontogenetic changes in the microtriches of tetraphyllideans, Caira and Ruhnke (1991) found complex changes on the surfaces of the bothridial apical suckers and distal bothridial loculi between plerocercoids and adults of *Calliobothrium verticillatum*. Awaiting definitive confirmation of the relationship between our plerocercoids and merocercoids, our study would suggest that, in tetraphyllideans, ontogenetic changes in tegumental morphology may also occur between other stages of the life cycle.

Although transmission electron microscopy (TEM) examination of the scolex tegument of our four larval types is necessary to clarify the function of the cilium-like projections of the plerocer-

Fig. 4. *Phyllobothrium delphini* from Mediterranean striped dolphins. SEM. A: Scolex. The letters correspond to the micrographs of each region as follows. B: Filitriches on the apical organ. C: Very slender blade-like spinitriches on the apical region of the scolex. D: Small area of the apical region of the scolex with short filitriches. E: Blade-like spinitriches interspersed with microtriches with appearance of filitriches on a bothridial accessory sucker. F: "Button" on bothridial accessory sucker (central cilium-like projection [arrowhead] surrounded by filitriches). G: Crowned cylindrical spinitriches (a crown marked with a circle) interspersed with filitriches on the distal bothridial loculus. H: Detail of the crown (marked with a circle) of a crowned cylindrical spinitrich. I: Detail of the distal bothridial loculus showing "buttons" on its surface (arrowhead). J: "Button" on the distal bothridial loculus (central cilium-like projection [arrowhead] surrounded by filitriches). K: Slender blade-like spinitriches on the proximal bothridium. L: Filitriches on the anterior part of the filament. Scale bars in A = 250 μm ; in B,C,E-G,J-L = 1,000 nm; in D = 500 nm; in H = 250 nm; in I = 50 μm .

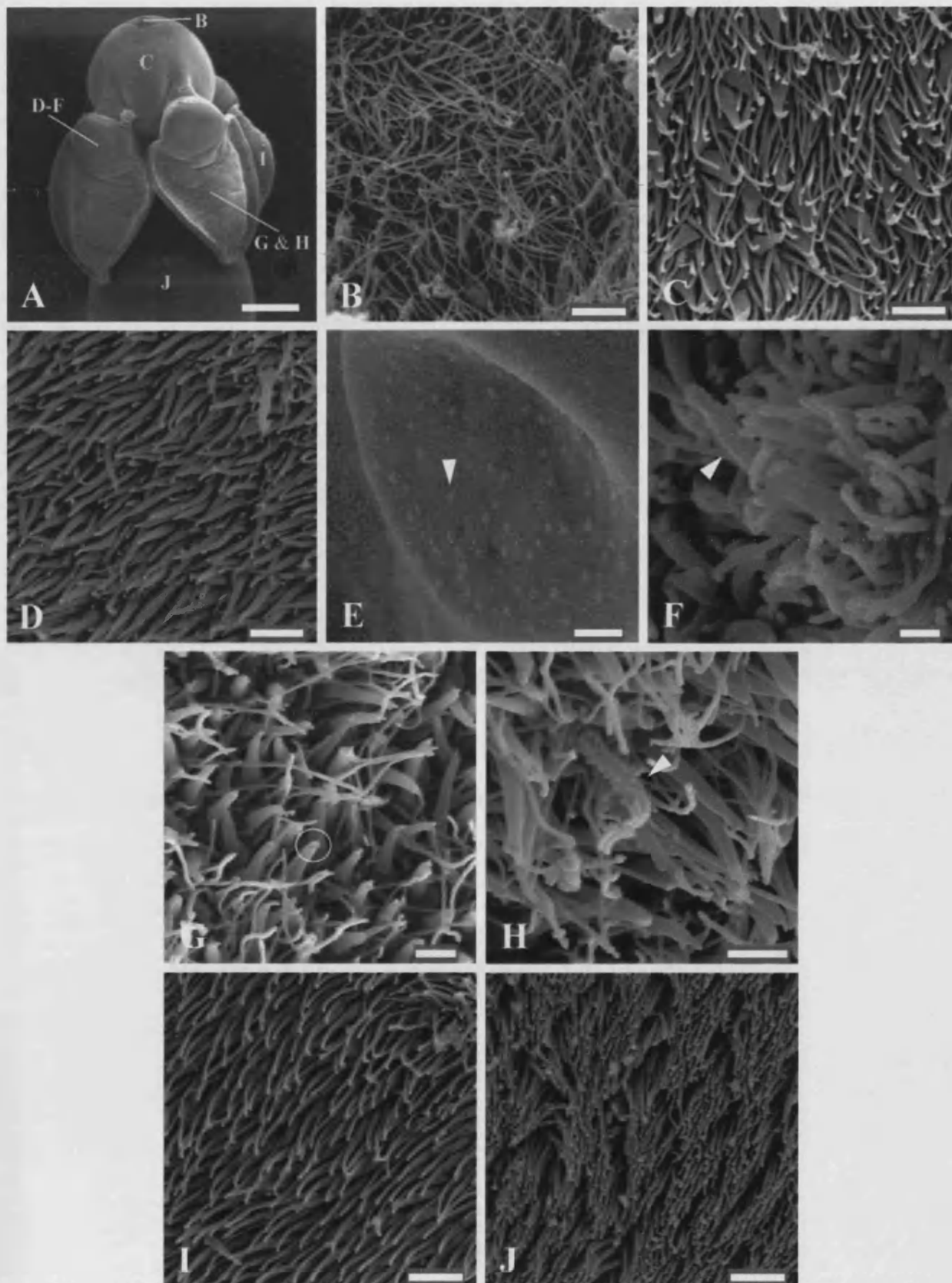


Figure 5

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

185

TABLE 1. Range (mean \pm SD) of measurements of microtriches from "small" and "large" plerocercoids

Region	Microthrix type*	"Small" plerocercoid	N; n	"Large" plerocercoid from anal canal	N; n	"Large" plerocercoid from liver	N; n
Apical sucker	F	1,029–1,771 (1,412 \pm 191) 55–91 (75 \pm 12)	2; 10	679–1,500 (894 \pm 209) 39–71 (55 \pm 9)	3; 10	1,281–2,278 (1,642 \pm 255) 54–76 (65 \pm 6)	2; 10
Apical region of the scolex	SBS	929–2,123 (1,325 \pm 237) 274–467 (343 \pm 45)	4; 10	829–1,813 (1,226 \pm 288) 156–282 (229 \pm 38)	3; 10	1,071–2,160 (1,614 \pm 237) 185–321 (221 \pm 39)	2; 10
Bothridial accessory suckers	BS	1,000–1,441 (1,211 \pm 102) 321–441 (380 \pm 38)	3; 10	727–1,370 (1,060 \pm 189) 182–342 (272 \pm 40)	3; 10	870–1,375 (1,119 \pm 152) 232–348 (276 \pm 26)	2; 10
Distal bothridial locus	BS	882–1,333 (1,179 \pm 106) 278–412 (351 \pm 35)	3; 10	788–1,579 (1,193 \pm 212) 237–377 (289 \pm 33)	3; 10	1,143–1,739 (1,422 \pm 161) 250–312 (287 \pm 14)	2; 10
Proximal bothridial locus	SBS	1,136–1,938 (1,496 \pm 201) 313–567 (436 \pm 68)	4; 10	1,185–1,896 (1,545 \pm 176) 182–403 (263 \pm 65)	3; 10	854–1,582 (1,231 \pm 293) 190–266 (240 \pm 19)	2; 10
Anterior body	BS	1,143–1,655 (1,430 \pm 137) 464–761 (585 \pm 76)	3; 10	1,185–2,049 (1,616 \pm 242) 180–463 (312 \pm 99)	3; 10	1,703–2,215 (1,950 \pm 152) 241–316 (277 \pm 18)	2; 10
Midbody	BS	1,000–1,586 (1,367 \pm 139) 429–679 (565 \pm 70)	3; 10	917–1,615 (1,188 \pm 170) 194–462 (280 \pm 86)	3; 10	872–1,128 (992 \pm 77) 200–292 (231 \pm 23)	2; 10
Posterior body	BS	586–1,105 (836 \pm 121) 290–538 (381 \pm 70)	3; 10	853–1,462 (1,098 \pm 145) 190–462 (314 \pm 76)	3; 10	542–821 (670 \pm 83) 167–231 (199 \pm 26)	2; 10

*F, filitrix; SBS, slender blade-like spinitrix; BS, blade-like spinitrix.

Two measurements were taken from each microthrix type; the first line corresponds to the length; the second line corresponds to the width. N, number of worms used for measurements; n, number of microtriches measured per worm and region. Measurements in nanometers.

coids and the "buttons" of the merocercoids, the external morphology and distribution of these structures suggest a sensory function. In our plerocercoids, cilium-like projections occur on the apical sucker and the surface of the accessory suckers and distal bothridial locus, three areas that contact the substratum. In other metacestodes, Gabrion and Euzet-Sicard (1979) and Casado et al. (1999) described structures externally similar to the cilium-like projections of our plerocercoids, with a similar scolex distribution; based on TEM observations, these authors proposed a sensory function. In the case of merocercoids, "buttons" occur on the accessory suckers and distal bothridial locus. Casado et al. (1999)

described similar papillae on the adherent surface of the bothridia and on the tegument between the bothridia and the pars post-bothridialis of the trypanorhynch *Gymnorhynchus gigas*. Palm et al. (1998) also described some "tufts of 'cap-dominated' filitriches with a central cilium" regularly distributed on the distal surface of bothridia of other trypanorhynch, *Bombycirhynchus sphyraenacum*. Both authors suggested a sensory function based on TEM observations.

Many authors share the opinion that the morphology and distribution of scolex microtriches have a taxonomic value at the specific level, but this view is based on observations of adult worms or metacestodes with a fully developed scolex (Carvajal et al., 1987; Caira, 1992; Ruhnke, 1994, 1996; Tyler and Caira, 1999; Caira and Tracy, 2002). In this context, Agustí et al. (2005b) recently provided a molecular analysis of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii* from Western Mediterranean striped dolphins, and the results suggested that these forms are different species and probably congeneric with *Clistobothrium montaukensis*. This evidence has some important implications regarding the use of tegumental morphology for cestode systematics. First, the molecular and morphological divergence between *P. delphini* and *M. grimaldii* is coupled with differences in microthrix morphology at the larval stage (consider, e.g., crowned cylindrical vs. cone-shape spinitriches on the distal surface of the bothridial locus) (Fig. 6). Second, the extent to which tegumental morphology changes

Fig. 5. *Monorygma grimaldii* from Mediterranean striped dolphins. SEM. A: Scolex. The letters correspond to the micrographs of each region as follows. B: Filitriches on the apical organ. C: Broad-based blade-like spinitriches interspersed with filitriches on the apical region of the scolex. D: Blade-like spinitriches interspersed with microtriches with appearance of filitriches on the bothridial accessory sucker. E: A bothridial accessory sucker showing "buttons" on its surface (arrowhead). F: "Button" on the bothridial accessory sucker (central cilium-like projection [arrowhead] surrounded by filitriches). G: Cone-shaped spinitriches (the two small parallel projections encircled) interspersed with filitriches on the distal bothridial locus. H: "Button" on the distal bothridial locus (central cilium-like projection [arrowhead] surrounded by filitriches). I: Slender blade-like spinitriches on the proximal bothridium. J: Filitriches on the anterior part of the filament. Scale bars in A = 100 μ m; in B–D, I, J = 1,000 nm; in E = 10 μ m; in F = 250 nm; in G, H = 500 nm.

TABLE 3. Range (mean \pm SD) of measurements of microtriches from *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*

Region	Microthrix type*	<i>Phyllobothrium delphini</i>	Microthrix type*	<i>Monorygma grimaldii</i>
Apical organ	F (N = 2; n = 10)	1,351–2,649 (1,767 \pm 435) 72–115 (97 \pm 9)	F (N = 2; n = 10)	1,163–2,353 (1,654 \pm 344) 51–81 (65 \pm 8)
Apical region of the scolex	VSBS (N = 2; n = 10)	1,678–2,601 (2,110 \pm 280) 140–315 (238 \pm 40)	BBBS (N = 2; n = 10)	845–1,585 (1,184 \pm 215) 296–488 (397 \pm 66)
			F (N = 2; n = 10)	1,037–1,707 (1,347 \pm 137) 85–134 (105 \pm 18)
Bothridial accessory suckers	BS (N = 3; n = 10)	1,000–2,143 (1,454 \pm 257) 164–321 (241 \pm 30)	BS (N = 2; n = 10)	986–1,360 (1,131 \pm 124) 155–360 (255 \pm 72)
Distal bothridial locusus	CCS (N = 3; n = 10)	859–1,957 (1,437 \pm 265) 143–236 (186 \pm 21)	CS (N = 2; n = 10)	1,142–1,775 (1,361 \pm 180) 178–444 (285 \pm 89)
	F (N = 2; n = 5)	736–1,350 (1,030 \pm 179) 67–107 (87 \pm 15)	F (N = 2; n = 10)	888–2,071 (1,534 \pm 300) 51–114 (78 \pm 24)
Proximal bothridial locusus	SBS (N = 2; n = 10)	588–1,773 (1,046 \pm 360) 88–284 (173 \pm 71)	SBS (N = 2; n = 10)	1,007–1,468 (1,257 \pm 148) 101–216 (163 \pm 35)
Anterior part of the filament	F (N = 2; n = 10)	360–857 (556 \pm 166) 72–143 (90 \pm 16)	F (N = 2; n = 10)	688–1,000 (833 \pm 98) 71–109 (92 \pm 9)

*F, filithrix; VSBS, very slender blade-like spinithrix; BS, blade-like spinithrix; CCS, crowned cylindrical spinithrix; SBS, slender blade-like spinithrix; BBBS, broad-based blade-like spinithrix; CS, cone-shaped spinithrix.

Two measurements were taken from each structure: the first line corresponds to the length; the second line corresponds to the width. N, number of worms used for measurements; n, number of microtriches measured per region and per worm. Measurements in nanometers.

between the merocercoid and the adult stage deserves investigation. Unfortunately, the adult stage of *P. delphini* and *M. grimaldii* is unknown, and information on microtriches of adults of spe-

cies of *Clistobothrium* is relatively incomplete (Ruhnke, 1993; Caira et al., 2001). However, our data suggest that clear differences exist between both *P. delphini* and *M. grimaldii* and some of the

TABLE 4. Range (mean \pm SD) of measurements of the structures observed in the "buttons" of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*

Region	Structure*	<i>Phyllobothrium delphini</i> (N = 2)	<i>Monorygma grimaldii</i> (N = 1)
Bothridial accessory suckers	CLP in "button" A (n = 1)	845 203	1,537 164
	F in "button" A (n = 5)	1,199–1,655 (1,385 \pm 206) 68–84 (73 \pm 7)	615–697 (668 \pm 31) 61–66 (62 \pm 2)
	CLP in "button" B (n = 1)	1,667 361	833 194
	F in "button" B (n = 5)	1,389–1,944 (1,600 \pm 230) 78–106 (93 \pm 12)	556–778 (633 \pm 87) 61–69 (64 \pm 3)
Distal bothridial locusus	CLP in "button" A (n = 1)	2,568	1,515
		372	212
	F in "button" A (n = 5)	1,216–1,622 (1,378 \pm 156) 68 \pm 0	1,091–2,121 (1,564 \pm 372) 61 \pm 0
	CLP in "button" B (n = 1)	2,364 376	1,120 220
	F in "button" B (n = 5)	1,455–1,818 (1,685 \pm 151) 61 \pm 0	820–1,400 (1,100 \pm 232) 48–52 (50 \pm 2)
	CLP in "button" C (n = 1)	1,902 543	
	F in "button" C (n = 5)	1,304–1,630 (1,413 \pm 139) 130–207 (163 \pm 35)	

*CLP, cilium-like projection; F, filithrix.

In the bothridial accessory suckers of both types of merocercoid, the structures of two buttons were measured ("button" A and B); in the distal bothridial locusus, the structures of three buttons were measured on *P. delphini* ("button" A, B, and C), and two buttons on *M. grimaldii* ("button" A and B). Two measurements were taken from each structure: the first line corresponds to the length; the second line corresponds to the width. N, number of worms use for measurements; n, number of structures measured per "button." Measurements in nanometers.



MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

187

TABLE 2. Range (mean \pm SD) of measurements of the putative sensory receptors from "small" and "large" plerocercoids

Region	Structure ^a	"Small" plerocercoid (N = 5)		"Large" plerocercoid from anal canal (N = 5)		"Large" plerocercoid from liver (N = 4)	
Apical sucker	CLP	(n = 1 ^b)	542	(n = 3)	741–822 (777 \pm 41)	(n = 2 ^b)	675–918 (797 \pm 172)
	CLP	(n = 1)	194 645 177		173–278 (221 \pm 53)		179–201 (190 \pm 16)
Bothridial accessory suckers	CLP	(n = 1 ^b)	1,084 206	(n = 2 ^b)	688–853 (771 \pm 117) 183–194 (189 \pm 8)	(n = 1 ^b)	785 219
	CLP	(n = 7)	516–1,032 (772 \pm 181) 177–245 (205 \pm 24)	(n = 1)	591 227	(n = 7)	750–1,095 (931 \pm 113) 201–227 (212 \pm 11)
	CLP in CLPF (A)	(n = 1 ^b)	971 166	(n = 1 ^b)	588 235		
	F in CLPF (A)	(n = 4)	371–557 (461 \pm 103) 57 \pm 0	(n = 3)	412–882 (686 \pm 245) 65–88 (80 \pm 14)		
	CLP in CLPF (B)	(n = 1 ^b)	848 161	(n = 1 ^b)	977 195		
	F in CLPF (B)	(n = 4)	263–819 (526 \pm 230) 53–58 (57 \pm 3)	(n = 4)	586–703 (645 \pm 50) 43–59 (49 \pm 8)		
	CLP	(n = 1 ^b)	933 200	(n = 2 ^b)	610–703 (657 \pm 66) 188–250 (219 \pm 44)	(n = 3 ^b)	875–1,460 (1,117 \pm 305) 217–237 (229 \pm 11)
	CLP	(n = 3)	556–710 (629 \pm 77) 114–252 (167 \pm 74)			(n = 4)	516–875 (739 \pm 156) 206–238 (224 \pm 14)
	CLP in CLPF (A)			(n = 1 ^b)	1,038 231	(n = 1)	985 219
	F in CLPF (A)			(n = 3)	538–885 (731 \pm 176) 42–69 (56 \pm 14)	(n = 4)	365–456 (406 \pm 48) 55–66 (62 \pm 5)
Distal bothridial locus	CLP in CLPF (B)			(n = 1 ^b)	1,154 262		
	F in CLPF (B)			(n = 4)	346–923 (644 \pm 283) 46–77 (67 \pm 15)		

^aCLP, cilium-like projection; F, filitrix.^bThe entire length of these structures was visible (see Materials and Methods).

Two measurements were taken from each structure: the first line corresponds to the length; the second line corresponds to the width. In the bothridial accessory suckers and distal bothridial locus of both types of plerocercoid, some cilium-like projections appear associated to few filitriches (CLPF); the structures of each association were measured and each association was labeled with a letter (A, B). N, number of worms used for measurements; n, number of structures measured. Measurements in nanometers.

known species of *Clistobothrium*, especially with respect to the distal acetabular surface that is covered with pectinate spinitriches interspersed with long filitriches in *C. carcharodon*, and with long filitriches in *C. montaukensis*. Unfortunately, the microtrich pattern of the third species of the genus, *C. tumidum*, has not yet been described.

Further molecular analyses, including material of "small" and "large" plerocercoids, *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*, and Mediterranean species of *Clistobothrium* would be the first step needed to clarify the life-cycle of the tetraphyllidean larvae occurring in striped dolphins. This would represent a baseline required for the completion, or correction, of our current hypothesis regarding the putative ontogenetic changes in tegumental morphology, which has potentially interesting functional and taxonomic implications.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues at the Unidad de Zoología Marina, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, for their assistance with the necropsies of dolphins, and the staff of the Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental of the Universidad de Valencia for their technical assistance with the SEM. We also thank Dr. D. Gibson (Natural History Museum, London) for detailed comments, and Dr. A. Kostadinova (Bulgarian Academy of Sciences) for assistance. Cetaceans were collected thanks to an agreement between the Conselleria de Medio Ambiente (Generalitat Valenciana) and the Universidad de Valencia. The first author holds a predoctoral fellowship from the Conselleria de Cultura, Educación y Ciencia of the Generalitat Valenciana.

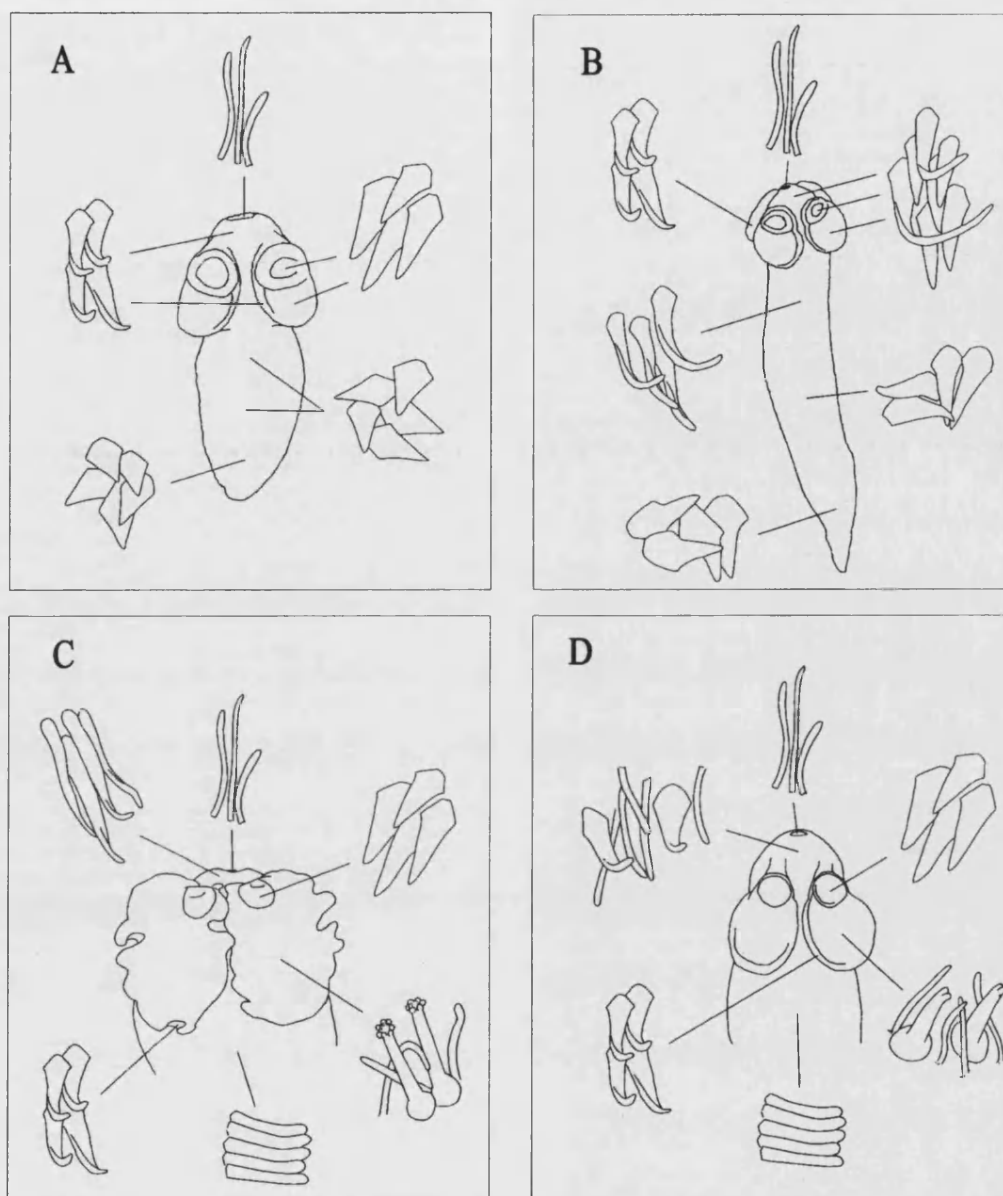


Fig. 6. Summary of the morphology and microthrix distribution patterns on the surface of the four types of tetraphyllidean metacercariae from Mediterranean striped dolphins. **A:** "Small" plerocercoid. **B:** "Large" plerocercoid. **C:** *Phyllobothrium delphini*. **D:** *Monorygmia girmaldii*.

LITERATURE CITED

- Agustí C, Aznar FJ, Raga JA. 2005a. Tetraphyllidean plerocercoids from Western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: a comprehensive morphological analysis. *J Parasitol* 91:83–92.
- Agustí C, Aznar FJ, Olson PD, Littlewood DTJ, Kostadinova A, Raga JA. 2005b. Morphological and molecular characterization of tetraphyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Western Mediterranean. *Parasitology* 130:461–474.
- Andersen K. 1975. Comparison of surface topography of three species of *Diphylobothrium* (Cestoda, Pseudophyllidae) by scanning electron microscopy. *Int J Parasitol* 5:293–300.
- Bester MN. 1989. Endoparasites of the subantarctic fur seal *Arctocephalus tropicalis* from Gough Island. *S Afr J Zool* 24: 363–365.
- Caira JN. 1992. Verification of multiple species of *Pedibothrium* in the Atlantic nurse shark with comments on the Australasian members of the genus. *J Parasitol* 78:289–308.
- Caira JN, Ruhnke TR. 1991. A comparison of scolex morphology between the plerocercoid and the adult of *Calliobothrium verticillatum* (Tetraphyllidae: Onchobothriidae). *Can Zool* 69: 1484–1488.
- Caira JN, Tracy R. 2002. Two new species of *Yorkeria* (Tetraphyllidae: Onchobothriidae) from *Chiloscyllium punctatum* (Elasmobranchii: Hemiscylliidae) in Thailand. *J Parasitol* 88:1172–1180.

MICROTRICHES OF TETRAPHYLLIDEAN METACESTODES

189

- Caira JN, Jensen K, Healy CJ. 1999. On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Syst Parasitol* 42:77–151.
- Caira JN, Jensen K, Healy CJ. 2001. Interrelationships among tetraphyllidean and lecanicephalidean cestodes. In: Littlewood DTJ, Bray R, editors. *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor and Francis. p 135–158.
- Carvajal J, Barros C, Whittaker FH. 1987. Scanning electron microscopy of the scolex of the plerocercus *Callitetrarhynchus gracilis* (Rudolphi, 1819) (Cestoda: Trypanorhyncha). *J Parasitol* 73:1265–1267.
- Casado N, Moreno MJ, Urrea-Paris MA, Rodriguez-Caabeiro F. 1999. Ultrastructural study of the papillae and presumed sensory receptors in the scolex of the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid (Cestoda: Trypanorhyncha). *Parasitol Res* 85:964–973.
- Cherry L. 2002. The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Syst Parasitol* 52:1–33.
- Coil WH. 1991. Platyhelminthes: Cestoidea. In: Harrison FW, Bogitsh BJ, editors. *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 3. Platyhelminthes and Nemertinea. New York: Wiley-Liss. p 211–283.
- Dailey MD. 1985. Diseases of Mammalia: Cetacea. In: Kinne O, editor. *Diseases of marine animals*, vol. 4. part 2. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. p 805–847.
- Dailey MD, Brownell RL. 1972. A checklist of marine mammal parasites. In: Ridgway SH, editor. *Mammals of the sea. Biology and medicine*. Springfield, IL: C.C. Thomas. p 528–589.
- Davydov VG, Korneva JV, Kuperman BI. 1995. The development of the tegument in ontogenesis of *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Folia Parasitol* 42:269–279.
- Delyamure SL. 1955. Helminth fauna of marine mammals (ecology and phylogeny). Moscow: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR. English translation by Raveh M. 1968. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations.
- Faliex E, Tyler G, Euzet L. 2000. A new species of *Ditrachybothridium* (Cestoda: Diphyllidea) from *Galeus* sp. (Selachii, Scyliorhynidae) from the South Pacific ocean, with a revision of the diagnosis of the order, family, and genus and notes on descriptive terminology of microtriches. *J Parasitol* 86:1078–1084.
- Gabriel C, Euzet-Sicard S. 1979. Étude du tégument et des récepteurs sensoriels du scolex d'un plerocercoid de Cestode Tetraphyllidea. *Ann Parasitol Hum Comp* 54:573–583.
- Geraci JR, Lounsbury VJ. 1993. Marine mammals ashore. A field guide for strandings. Galveston, TX: Texas A&M University Sea Grant College Program.
- Hoberg EP, Sims DE, Odense PH. 1995. Comparative morphology of the scolices and microtriches among five species of *Tetrabothrius* (Eucestoda: Tetrabothriidae). *J Parasitol* 81:475–481.
- Jones MK. 1998. Structure and diversity of cestode epithelia. *Int J Parasitol* 28:913–923.
- Khalil AI. 1995. Scanning and transmission electron microscopic studies of the tegument and parenchyma of tetraphyllid pleurocercoid. *J Egypt Ger Soc Zool* 18:19–41.
- Lumsden RD. 1975. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp Parasitol* 37:267–339.
- Osaki Y. 1990. Ultrastructural studies on the plerocercoid of *Spirometra erinacei* in experimental sparganosis. *Parasitol Res* 76:466–472.
- Palm HW, Poynton SL, Rutledge P. 1998. Surface ultrastructure of plerocercoids of *Bombycyrhynchus sphyraenaicum* (Pintner, 1930) (Cestoda: Trypanorhyncha). *Parasitol Res* 84:195–204.
- Raga JA. 1994. Parasitismus bei den Cetacea. In: Robineau D, Duguy R, Klima M, editors. *Handbuch der Säugetiere Europas*. Wiesbaden, Germany: Aula-Verlag Wiesbaden. Band 6/I A Meeressäuger. Teil I A: Wale und Delphine 1. p 132–179.
- Ruhnke TR. 1993. A new species of *Clistobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea), with an evaluation of the systematic status of the genus. *J Parasitol* 79:37–43.
- Ruhnke TR. 1994. *Paraorygmatobothrium barberi* n. g., n. sp. (Cestoda: Tetraphyllidea), with amended descriptions of two species transferred to the genus. *Syst Parasitol* 28:65–79.
- Ruhnke TR. 1996. Systematic resolution of *Crossobothrium* Linton, 1889, and taxonomic information on four species allocated to that genus. *J Parasitol* 82:793–800.
- Thompson RCA, Hayton AR, Jue Sue LP. 1980. An ultrastructural study of the microtriches of adult *Proteocephalus tidswelli* (Cestoda: Proteocephalidea). *Z Parasitenk* 64:95–111.
- Tyler GA, Caira JN. 1999. Two new species of *Echinobothrium* (Cestoidea: Diphyllidea) from myliobatiform elasmobranchs in the Gulf of California, México. *J Parasitol* 85:327–335.

4.4. INSIGHT INTO THE ROLE OF CETACEANS IN THE LIFE CYCLE OF THE TETRAPHYLLIDEANS (PLATYHELMINTHES: CESTODA).

Insight into the role of cetaceans in the life cycle of the tetraphyllideans
(Platyhelminthes: Cestoda)

F. J. Aznar¹, C. Agustí^{1*}, D. T. J. Littlewood², J. A. Raga¹ and P. D. Olson²

¹ *Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology,
University of Valencia, P.O. Box 22085, 46071 Valencia, Spain*

² *Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7
5BD, UK*

Research paper

*Corresponding author. Tel: +34 96 354 36 85, Fax: +34 96 354 37 33.

E-mail address: celia.agusti@uv.es (C. Agustí).

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank under the accession numbers: AY741591-AY741606; DQ839568-93.

Abstract

Four types of tetraphyllidean larvae infect cetaceans worldwide: two plerocercoids differing in size, 'small' (SP) and 'large' (LP), and two merocercoids named as *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii*. The adult stage of these larvae is not known and, therefore, the role of cetaceans in the life cycle of these species has become a long-standing problem. The SP and LP are thought to be earlier stages of the merocercoids which, in turn, are thought infect large sharks that feed on cetaceans. A molecular analysis of the D2 variable region of the 18S rDNA gene using several specimens of each larval type collected from three Mediterranean species of cetaceans revealed 4 unique LSU signatures corresponding with each type; sequences were identical regardless of host species and intrahost habitat. The degree of divergence suggested that the LP, *P. delphini* and *M. grimaldii* may represent separate species, whereas the SP may be conspecific with *M. grimaldii*. In all host species, individuals of SP accumulated in gut microhabitats associated to a developed lymphoid tissue, and might therefore use the lymphatic system to migrate to the abdominal mesenteries and become *M. grimaldii*. The plerocercoid stage of *P. delphini* remains unknown. In a partial phylogenetic tree of the Tetraphyllidea, all larvae formed a clade together with *Clistobothrium montaukensis*, a parasite of mackerel sharks that often feed on cetaceans. We therefore postulate that cetaceans are intermediate hosts for *P. delphini* and *M. grimaldii*. Other data are consistent with this hypothesis, i.e., the specialised cystic structure of these larvae, their microhabitats in cetaceans and the observation that infections occur mostly offshore. Since most tetraphyllideans use fish and cephalopods as intermediate hosts, the inclusion of cetaceans in the life cycle of species infecting large sharks could have been advantageous: larvae could avoid the mortality associated to the cetacean predation and could enhance transmission to sharks. The biological significance of infections of LP in cetaceans is unclear, but infections do not seem to be accidental because larvae show high prevalence and abundance and select very specific sites, namely, the anal crypts and bile ducts.

Keywords: Tetraphyllidea; Plerocercoid; *Phyllobothrium delphini*; *Monorygma grimaldii*; *Clistobothrium*; Cetacean; Molecular diagnostics; Life cycle

1. Introduction

Four types of tetraphyllidean metacestodes (terminology of larval cestodes follows Chervy, 2002) have been recognized in marine mammals worldwide (Agustí *et al.*, 2005a, b). Two of them are plerocercoids collectively referred to as *Scolex pleuronectis* Müller, 1788, that occur throughout the gut and hepatopancreatic ducts. These two forms exhibit the same morphology but can be clearly distinguished by size differences, hence the names 'small' (SP) and 'large' (LP) used to differentiate them (Agustí *et al.*, 2005a). Two other types are bladder-like merocercoids with clear morphological, molecular and microhabitat differences: *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) Van Beneden, 1868, occurring in the subcutaneous blubber, and *Monorygma grimaldii* (Moniez, 1889) Baylis, 1919 in the abdominal cavity (Agustí *et al.*, 2005b, and references therein).

The inability to positively identify the adult stage of these larvae has severely hampered our knowledge about key aspects of their biology. First, the actual number of species infecting marine mammals is unknown. Early attempts to identify species based on larval morphology (Testa and Dailey, 1977, and references therein) have been inconclusive (Agustí *et al.*, 2005b). Second, the relationship among larval types is unclear. It has been suggested that the SP and the LP might be earlier stages of *P. delphini* and *M. grimaldii* (Skrjabin, 1972; Fernández *et al.*, 2003; Agustí *et al.*, 2005a). However, this hypothesis was based on circumstantial evidence, i.e., the morphological resemblance of the scolex, the co-occurrence of the four larval types in the same individual hosts, and the presence of plerocercoids close to the microhabitats where the merocercoids are found (Agustí *et al.*, 2005a). Finally, the role of marine mammals in the life cycle of these larvae is still debated (Williams, 1968; McColl and Obendorf, 1982; Walker, 2001; Raga *et al.*, 2002). In a recent molecular analysis of *P. delphini* and *M. grimaldii* from western Mediterranean striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, the merocercoids showed a high level of genetic similarity with *Clistobothrium montaukensis* Ruhnke, 1993 (Agustí *et al.*, 2005b), suggestive of congeneric status. Since species of *Clistobothrium* infect sharks that include cetaceans in their diet (Ruhnke, 1993; Cortés, 1999), it may be that the mammals form an obligatory role in the tetraphyllidean life cycle.

In this paper we carry out an extensive survey of three cetacean species in the Western Mediterranean, including a molecular analysis and a detailed description of the microhabitats of the four tetraphyllidean larval morphotypes that commonly infect these hosts. The results not only shed light on the phylogenetic relationships among the larval types, their identity and site specificity, and the role of cetaceans in their life cycles, but also raise new stimulating questions.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Fifty striped dolphins, *S. coeruleoalba* (27 males, range of total length 150-213 cm; 23 females, 106-211 cm), 8 Risso's dolphins, *Grampus griseus* (4 males, 172-308 cm; 4 females, 289-305 cm), and 4 bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (3 males, 238-322 cm; 1 female, 260 cm) stranded during 1990-2003 along the Mediterranean coast of Spain (between 42°20'N, 3°11'E and 37°34'N, 1°04'W), were analysed for tetraphyllidean larvae. All carcasses examined were in good condition (codes 2-3 sensu Geraci and Lounsbury, 1993). Larval types were identified according to the morphological descriptions of Agustí *et al.* (2005a, b).

Organs were not always available for analysis of all larval types; the sample size in each case is given in Table 1. Hosts were examined fresh for the presence of *P. delphini* and *M. grimaldii*. The former was detected through transversal and longitudinal slices on subcutaneous blubber. Radial cuts were made every 0.5 cm from the anal-genital slits, the region where these larvae mostly occur (Walker, 2001 and references therein). Searching was stopped when no larva was found after 20 consecutive cuts. The peritoneum and mesenteries of the abdominal cavity were thoroughly examined for *M. grimaldii*.

The stomach, intestine, liver and pancreas were generally frozen for subsequent examination, although in some dolphins organs were analysed fresh. After thawing, organs were examined for SP and LP. The three stomach chambers (i.e., forestomach, main stomach and pyloric stomach) were examined separately. The intestine was divided into 20 sections of equal length (approximately 1 m). The contents of each chamber and intestinal section were flushed with physiological saline through a sieve 0.2 mm mesh, solid remains being collected in a Petri dish. The wall of each chamber/section was examined under a stereomicroscope to detect larvae *in situ*. The hepatic and pancreatic ducts were opened and examined under a stereomicroscope, and the liver and pancreas were subsequently sliced and washed on a sieve to collect plerocercoids that may have been overlooked *in situ*. Plerocercoids were fixed in 70% (v/v) ethanol.

Although we attempted to collect and count all larvae infecting each individual host, there were obvious difficulties to make accurate calculations when dolphins were not very fresh, particularly in the case of plerocercoids. Therefore, we adopted a gross intensity index (INI) for all larval types: 1 (1-10 larvae); 2 (11-100); 3 (101-1000), and 4 (>1000). The index was always assigned by the same observer (C.A.).

2.2. Molecular analysis

Samples of the four larval types were collected from the three dolphin species and fixed in 95% ethanol for molecular diagnostic analysis. The D2 variable region (~650 bp) of the nuclear large subunit ribosomal DNA (lsrDNA) gene was characterized from a total of 26 specimens and combined with 8 D2 sequences (**AY741591-AY741606**) each of *M. grimaldii* and *P. delphini* from the work of Agustí *et al.*, 2005b (see Table 2 for the hosts and microhabitats sampled). The D1-D3 regions (~1,400) were characterized from one LP (Sc25-PGA; **DQ839568**) in order to test the variability of the more conserved D1 and D3 regions, but were found to be too conserved for comparisons among the larval types with the adult reference sequences. No specimen from the pyloric stomach of any host species was available for molecular analysis.

Scolecemes of each specimen analysed genetically were retained for vouchers prior to genomic DNA (gDNA) extraction and deposited in the helminth collection of The Natural History Museum, London. gDNA was extracted from the specimens using a Qiagen DNeasy™ tissue kit and used for PCR as described by Olson *et al.* (2003). A fragment (~1400 bp) of the lsrDNA gene spanning domains D1-D3 was amplified using primers LSU5 (5'-TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC-3') and 1200R (5'-GCA TAG TTC ACC ATC TTT CGG-3') and the middle portion spanning the variable D2 region sequenced bidirectionally using internal primers 300F (5'-CAA GTA CCG TGA GGG AAA GTT-3') and ECD2 (5'-CTT GGT CCG TGT TTC AAG ACG GG-3'). This region of the LSU has proven informative for both diagnostic and phylogenetic work in tetraphyllidean and related taxa (e.g. Agustí *et al.*, 2005b; Brickle *et al.* 2001; Reyda and Olson, 2003). Contiguous sequences were assembled and edited using Sequencher™ (GeneCodes Corp., ver. 4), and leading and trailing regions of the sequences without overlap were removed prior to analysis. Sequences are available from GenBank under Accession nos. **DQ839568-93** (see also Fig. 1).

Sequences were screened using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to confirm their orthology with the LSU genes of cestodes and aligned by eye using MacClade ver. 4.06 (Maddison and Maddison, 2000). A single representative sequence of each larval type from cetaceans was analyzed together with 20 lsrDNA available tetraphyllidean sequences (see Agustí *et al.*, 2005b). Phylogenetic affinities were estimated by Bayesian analysis using MrBayes ver. 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Based on the results of MrModeltest ver. 1.1b (Nylander, 2002; a simplified version of ModelTest by Posada and Crandall, 1998), a general time reversible model of nucleotide substitution incorporating among site rate variation and invariant sites was specified and the analysis run over 1 million generations, sampling topologies every 100th generation. Other program parameters were as specified in Olson *et al.* (2003). A consensus tree was constructed using the 'sumt' command with a 'burnin' value of 100 and the 'contype=allcompat' option. Trees were rooted using *Echeneibothrium maculatum* based on prior analysis of tetraphyllidean and

related LSU sequences (see Reyda and Olson, 2003). Comparisons of uncorrected genetic distances (shown parenthetically as the percent difference; i.e. no. of substitutions/no. of sites compared * 100) were calculated using PAUP* ver. 4.0b10 (Swofford, 2001) as were bootstrap values.

2.3. Habitat selection analysis

Based on the results of the molecular analysis, we investigated patterns of habitat selection by each larval type. The following sites were considered as different microhabitats for comparison (Fernández *et al.*, 2003; Agustí *et al.*, 2005a, b and references therein): subcutaneous blubber, peritoneum + mesenteries of the abdominal cavity, forestomach, main stomach, pyloric stomach, intestinal sections 1-19, intestinal section 20, and bile ducts (hepatic + pancreatic ducts). Due to sample size limitations, statistical comparisons of intrahost distribution of each larval type were performed only in the striped dolphin (Table 1). Differences in the frequency of occurrence were compared using Cochran's tests with MacNemar post hoc comparisons (Conover, 1999). Differences in INI were tested with Friedman tests with post hoc comparisons (Conover, 1999). Kendall tests were used to examine predictability in habitat selection. In multiple comparisons, probability values were corrected by the sequential Bonferroni Procedure (Rice, 1989). Ecological terminology follows Bush *et al.* (1997). Analysis were carried out with the package SPSS v.12.0 for Windows. The free software Quantitative Parasitology, v. 2.0 (Rózsa *et al.*, 2000), was used to calculate infection parameters (Tables 3, 4).

2.4. Patterns of host-parasite relationships

All available records of LP and SP are summarized in Agustí *et al.* (2005a). We conducted an exhaustive bibliographical search of reports of *P. delphini* and *M. grimaldii*. Host species were divided into three categories: (1) Not sufficiently analysed, when the number of host individuals analysed was < 5; (2) accidental, when the prevalence of *P. delphini* and/or *M. grimaldii* was < 10%, and (3) common, when prevalence was ≥ 10%. Assignment to a given category was based on information pooled from all existing reports as we were interested in global patterns. For brevity, we report only key papers that summarize most references. We followed Evans and Raga (2001) for current nomenclature of host species, with the updates of Dalebout *et al.* (2002). Data regarding the habitat of cetaceans and pinnipeds was obtained from Ridgway and Harrison (1981a,b, 1985, 1989, 1994, 1999).

3. Results

3.1. Molecular analysis

Each of the four larval morphotypes exhibited a unique *lsrDNA* signature regardless of the host species or microhabitat in which they were found; no variation in the D2 region was found within each morphotype, albeit divergence among the four types was small. Unexpectedly, the small form '*Scolex pleuronectis*' (SP) differed by only a single transition (G↔A) from *M. grimaldii* (0.2% raw divergence), whereas SP differed from the large form '*Scolex pleuronectis*' (LP) by four G↔A and two T↔C transitions (1.2%). The *P. delphini* isolates were most similar to *M. grimaldii* (0.6%), then to SP (0.8%), and least similar to LP (1.5%).

A total of 515 characters were included in the analysis of the D2 region of the 24 adult and larval tetraphyllidean taxa of which 215 characters were parsimony informative. Interrelationships of the adult taxa based on Bayesian inference (Fig. 1) were effectively as those found in Agustí *et al.* (2005b), and the four larval forms formed a clade closest to *Clistobothrium montaukensis*. To emphasize graphically the small divergence among the larval taxa and *C. montaukensis*, Fig. 1 enlarges the clade including these taxa and its sister clade comprising *Phyllobothrium lactuca*, *Ceratobothrium xanthocephalum* and a larval tetraphyllidean collected from a longfin Patagonian squid, *Loligo gahi* (see Brickle *et al.*, 2001). Bayesian posterior probabilities and bootstrap values were generally low owing to the small number of differences among the sequences.

3.2. Habitat selection analysis

The four larval types were found in all host species with moderate to high prevalences (Tables 3, 4). In all host species, *P. delphini* occurred primarily in the subcutaneous blubber around the anal-genital slit. However, in moderately to heavily parasitized striped dolphins (INI = 3; see Table 3), the distribution extended into the blubber up to the dorsal fin and the caudal peduncle. In all host species, individuals of *M. grimaldii* were found in the peritoneum of the abdominal cavity, specially around the genital region, occurring also in the mesenteries of the uterus, testes and colorectal region.

Individuals of LP were found free in the lumen of stomach (rarely), intestine and bile ducts, and inside anal crypts. The intrahost distribution was similar among the 3 host species, except that no worm was found in the bile ducts of bottlenose dolphins (Tables 4, 5). In the striped dolphin, there were highly significant differences in frequency of occurrence among microhabitats (Cochran test, $Q = 133.1$, $n = 31$, $p < 0.001$). The post hoc pattern of differences (McNemar tests, $p < 0.05$) was as follows: anal crypts = bile ducts > intestinal sections 1-19 > stomach chambers (Table 4). A

comparison of INI between the three former microhabitats (Table 5) indicated that the number of LP in anal crypts > bile ducts > intestinal sections 1-19 (Friedman test with post hoc comparison, $p < 0.002$). The Kendall test indicated that this ordination was highly conserved from host to host ($W = 0.89$, 2d.f., $p < 0.001$). In some hosts, over 1,000 worms were found inside anal crypts (Table 5).

The intrahost distribution of SP was similar among the 3 host species (Tables 4, 5). Worms were found free in the lumen of the glandular part of the stomach (i.e., the main and pyloric stomach) and the intestine. The majority of individuals were found buried in the mucosa of the pyloric stomach and the intestine, with particularly large concentrations, sometimes over several thousand individuals, in the terminal colon and rectum (Table 5). No worm was found in bile duct of any host. In the striped dolphin, the frequency of occurrence differed significantly among microhabitats. A Cochran test with post hoc MacNemar tests ($p < 0.05$) showed that the occurrence in the pyloric stomach > main stomach = forestomach. Pairwise MacNemar tests ($p < 0.05$) between pyloric stomach, intestinal sections 1-19, and section 20 showed that the occurrence in the intestinal section 20 = pyloric stomach > intestinal sections 1-19 (Table 4). A comparison of INI between the three later microhabitats (Table 5) indicated significant differences only between sections 1-19 and section 20 (Friedman test with post hoc comparison, $p < 0.001$). The Kendall test indicated that infection levels per microhabitat were similarly ordered from host to host ($W = 0.53$, 2d.f., $p < 0.001$). In section 20, the maximum concentration of SPs occurred in the terminal colon adjacent to the rectum of 90.6% of 32 striped dolphins, 40% of 5 Risso's dolphins (in the latter, 60% of hosts harboured SPs in terminal colon and rectum) and 100% of 3 bottlenose dolphins.

3.3. Patterns of host-parasite relationships

Occurrence of tetraphyllidean merocercoids in cetaceans and pinnipeds are shown in Table 6. Three patterns are apparent. First, *P. delphini* or *M. grimaldii* have never, or rarely, been reported in most species of mysticetes; the only exception is the study of Rice (1977) on *Balaenoptera borealis*. Second, in odontocetes, there is a broad segregation between inshore species (harbouring few or no tetraphyllidean larvae) and offshore species (in which these larvae are common). There are few apparent exceptions to this pattern (Best and Abernethy, 1994; Slooten and Dawson, 1994). Finally, in pinnipeds, tetraphyllidean merocercoids are uncommon, with few exceptions (i.e. George-Nascimento and Carvajal, 1981; Lauckner, 1985; Soares, 1986; Bester, 1989).

4. Discussion

4.1. Taxonomic identity and relationship among larval types

The molecular analysis shows four unique LSU signatures that correspond with the four morphological types of tetraphyllidean larvae thus far described in cetaceans, i.e. *P. delphini*, *M. grimaldii*, SP and LP. Within each type signatures were identical regardless of host species and microhabitat. Several authors have reported different morphotypes of *P. delphini* in the same locality and have suggested that they represent different species (see Testa and Dailey, 1977; Dailey, 1985). Although we also found substantial morphological variability in specimens of *P. delphini* from the same locality (Agustí *et al.*, 2005b), the present study confirms previous suggestions that this variability could be largely intraspecific (see Siquier and Le Bas, 2003; Agustí *et al.*, 2005b).

The partial phylogenetic tree of the Tetraphyllidea indicates that the four larval types occurring in cetaceans are closely related. Contrary to what had been hypothesized previously (Skrjabin, 1972; Agustí *et al.*, 2005a), the molecular analysis indicated that SP and LP represent different taxonomic entities, and that LP is not the larval stage of either *P. delphini* or *M. grimaldii*. However, the analysis cannot rule out that SP might be the plerocercoid stage of *M. grimaldii*, albeit it may represent a distinct population from those larval forms provisionally identified as *M. grimaldii* herein. The previous stage of development of *P. delphini* remains unknown. To clarify this issue, it would be necessary to do a more exhaustive sampling of larvae, e.g., of SP from habitats not analysed in the present study (i.e., the pyloric stomach).

Considering the morphological variation present among these larval types (see also Agustí *et al.*, 2005a,b), it is surprising how little variation is present in this gene region as compared to that among the other genera in the analysis (Fig. 1). However, with so few tetraphyllidean species characterized genetically, we are far from knowing if a genetic 'ruler' with which to predict taxonomic boundaries will be possible. Moreover, the Tetraphyllidea is a species-rich group containing many forms with life cycles that involve large, pelagic sharks comparable to that of *Clistobothrium* in makos. Nevertheless, divergences among the larvae are consistent with these forms being members of the genus *Clistobothrium*, at least as compared to other parasitic platyhelminths for which such data are available (Marques *et al.*, submitted; Olson and Tkach, 2005; Olson *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2002; Reyda and Olson, 2003; Tkach *et al.*, 2003), as the prevailing concept of species in the parasitic flatworms relies primarily on the morphology of adult characteristics, it would have little utility to make nomenclatural assignments on the basis of DNA alone. Genetic characterization of the tetraphyllidea of pelagic sharks in the Mediterranean would very likely recover exact matches for at least some of the larvae parasitizing cetaceans and would allow for their proper taxonomic placement.

4.2. Habitat selection

Our study shows that each larval type occurs predictably in specific microhabitats within the host regardless of dolphin species. The only obvious difference among hosts is that the LP were found in the bile ducts of striped and Risso's dolphin but not in those of bottlenose dolphins. However, this difference could result from a bias related to the very low sample size of bottlenose dolphins examined.

The microhabitats of *P. delphini* and *M. grimaldii* described in this study, i.e., the subcutaneous blubber and the abdominal peritoneum and mesenteries, mainly of the anal-genital region, are the same as those reported previously in most species of cetaceans and pinnipeds (George-Nascimento and Carvajal, 1981; McColl and Obendorf, 1982; Bester, 1989; Norman, 1997; Gibson *et al.* 1998; Walker, 2001 and references therein). The question remains how these cystic larvae arrive to these sites. Skrjabin (1972) suggested that *P. delphini* and *M. grimaldii* would enter cetaceans as plerocercoids and would use the blood system, the lymphatic system, or both, to reach their final microhabitats where they transform into merocercoids. Our study shows that individuals of SP concentrate in a specific area of the colorectal region where the mucosa and submucosa is rich in lymphoid nodules (Simpson and Gardner, 1972). Interestingly, this region is directly connected with the peritoneum of the body cavity through a short mesentery harbouring mesocolic nodes (Cowan and Smith, 1999). This short mesentery would be the shortest way for SP from the colorectal mucosa to reach the microhabitats of *M. grimaldii* (peritoneum of the body cavity) through the lymphatic system. Significant concentrations of SP also occurred in the wall of the pyloric stomach, the submucosa of which contains well-developed lymphatic nodules (Simpson and Gardner, 1972). This microhabitat could serve as an alternative site for the plerocercoid stage of *M. grimaldii* to enter the lymphatic system. The small number of SP found in the lumen of other parts of the gut would be suggestive of migrating larvae.

Individuals of LP tended to accumulate mainly within anal crypts in all dolphin species. The presence of very low numbers in the lumen of the stomach and intestine would suggest that larvae migrate passively throughout the gut. Individuals of LP were also observed, in moderate amounts, as free larvae in the lumen of bile ducts of striped and Risso's dolphins. There are two alternative ways through which the larvae could reach this microhabitat. Perhaps the individuals of LP from anal crypts could enter the underlying blood vessels. If so, it would be possible that some larvae could arrive to the liver migrating through the portal system. Alternatively, individuals of LP could enter the hepatopancreatic duct from its distal opening, which occurs in first intestinal section in the three cetacean species analyzed. In any event, the reason why the same type of larvae tend to accumulate in these two disparate microhabitats is unclear (see the last section).

4.3. Patterns of host-parasite relationships

Although tetraphyllidean larvae appear to be ubiquitous in the marine realm, they show two broad patterns of infection in marine mammals. First, our results, and those by Agustí *et al.* (2005a), clearly suggest that tetraphyllideans usually infect marine mammals feeding on fish and/or cephalopods. This would explain why the occurrence in baleen whales feeding on krill is incidental (see also Skrjabin, 1972): larvae only appear when fish make up a substantial portion of whales' diet (Rice, 1977). Second, tetraphyllidean larvae mostly occur in marine mammals inhabiting offshore waters. With a single exception, all records of SP and LP (Agustí *et al.*, 2005a) are restricted to offshore odontocetes, and a similar tendency can be observed in *P. delphini* and *M. grimaldii*. The pattern is particularly well illustrated in the case of host species with populations inhabiting inshore and offshore waters. For instance, the infection levels of *P. delphini* have been used to distinguish inshore and offshore stocks of *Tursiops truncatus* (Walker, 1981; Van Waerebeek *et al.*, 1990; Hoelzel, 1998). The rarity of tetraphyllidean infections in fish-eating pinnipeds might therefore be related to the usual coastal foraging of these hosts, rather than to the inability of the larvae to survive in pinnipeds. For instance, sub-Antarctic fur seals, *Arctocephalus tropicalis*, harbour frequent infections with *P. delphini* when these hosts forage in oceanic areas (Bester, 1989). In summary, the occurrence of tetraphyllidean larvae in marine mammals appears to be driven mainly by ecological factors, i.e., host habitat and diet.

4.4. Role of cetaceans in the life cycle of tetraphyllideans

Two lines of evidence have traditionally supported the hypothesis that marine mammals are intermediate hosts, and large predatory and/or scavenger pelagic sharks are the most probable definitive hosts, for *P. delphini* and *M. grimaldii* (Southwell and Walker, 1936; Johnston and Mawson, 1939; Dollfus, 1964; Testa and Dailey, 1977; Walker, 2001; Agustí *et al.*, 2005b). First, *P. delphini* and *M. grimaldii* are morphologically specialised larvae that only appear in marine mammals; therefore, some ontogenetic change must be postulated to occur within these hosts. The peculiar morphological modification as a fluid-filled bladder is exceptional among the Tetraphyllidea (Chervy, 2002), and is thought to have some adaptive value in transmission (Norman, 1997). Second, the microhabitats selected by both *P. delphini* and *M. grimaldii* in marine mammals might enhance transmission to their putative definitive hosts (Geraci and Aubin, 1987; Garippa *et al.* 1991; Walker, 2001). Marine mammals represent important trophic resources for large sharks (Long and Jones, 1996; Cortés, 1999; Heithaus, 2001) which often consume only specific parts of marine mammals (Martin *et al.*, 2005), particularly the abdominal and caudal region (Long and Jones, 1996; Walker, 2001).



Results from this study strongly support the aforementioned hypothesis. There was a close relationship, as indicated by the molecular analysis, between the larval types occurring in dolphins, and the adult of *C. montaukensis*. Species of *Clistobothrium* are restricted to large pelagic (mackerel) sharks (Ruhnke, 1993). This relationship is reinforced by the fact that *P. delphini* and *M. grimaldii* predominate among offshore marine mammals, thus suggesting that the life cycle is normally completed in this environment. In the Mediterranean Sea, for instance, large juveniles and adults of white shark, *Carcharodon carcharias*, feed mainly on odontocetes and large pelagic fish (Fergusson, 1996; Fergusson *et al.*, 2000). On the other hand, the molecular and habitat selection analyses suggest that *M. grimaldii* would enter dolphins as plerocercoids (SP) and would follow a predictable migratory pathway to reach the microhabitats where they would transform into the cystic (merocercoid) stage.

How could the relationship between these tetraphyllidean larvae and marine mammals have evolved? Phylogenetic studies suggest a deep age (> 100 my.) for the origin of association between tetraphyllideans and chondrichthyans (Hoberg *et al.*, 1999). The ancestors of cetaceans and pinnipeds entered the sea much later, in the Eocene (55-34 my.) and Late Oligocene epochs (27-25 my.), respectively (Fordyce, 2002; Berta, 2002). These events altered the structure of trophic webs because marine mammals could act as both new top predators and potential prey. Within this scenario, many tetraphyllidean larvae would now end up in marine mammals which, in turn, might be consumed by some shark species. If the cost of survival in marine mammals was low, and shark predation rate was sufficiently high, a 'downward incorporation' (Parker *et al.*, 2003a) of marine mammals in the established life cycle of tetraphyllideans could have been advantageous. First, marine mammals can accumulate far more larvae than fish or cephalopods because they are large, long-lived, endotherm predators exhibiting high consumption rates (Williams *et al.*, 2001). Therefore, larvae would avoid the mortality associated with marine mammal predation and would increase transmission rate to definitive hosts (Parker *et al.*, 2003a). In addition, a large accumulation of larvae might increase the probability of finding mates in the definitive host (Brown *et al.*, 2001), promoting also genotype mixing in the intermediate host (Rauch *et al.*, 2005) (note, however, that intraspecific competition could also increase). Finally, because of the large size of marine mammals, larvae could reach larger sizes and greater development without being lethal to the host (Parker *et al.*, 2003b). A major benefit of this strategy is that the larvae could reproduce immediately upon arrival to the definitive host. Interestingly, in the merocercoid stage of *P. delphini*, the scolex seems to be fully developed, and some individuals have even begun proglottization (Agustí *et al.*, 2005b).

The role of Mediterranean dolphins in the life cycle of the LP is more difficult to establish. Our result indicate that the LP is a close relative to species of *P. delphini* and *M. grimaldi* but would not transform into merocercoid in dolphins. Since tetraphyllideans are usually found at the plerocercoid stage in fish, cephalopods and other marine invertebrates (Euzet, 1959; Threlfall, 1970;

Wojciechowska, 1993; Caira and Reyda, 2005), it is possible that individuals of LP are simply plerocercoids accidentally acquired with prey. However, in dolphins, these larvae were found with high prevalence and abundance, and underwent predictable migrations to specific microhabitats, namely, the anal crypts and bile ducts. This behaviour is not well understood and raises a number of questions, but should not be expected in larvae accidentally ingested. One might speculate that the LP is adapted to avoid the strong flow associated to digestion by selecting safe sites, particularly the anal crypts. This would somehow imply that dolphins might act at least as paratenic hosts for these parasites. The fact that LP clusters together with *C. montaukensis*, and occur only in offshore cetaceans (Agustí *et al.*, 2005a), would support this contention.

Acknowledgements

We thank our colleagues from the Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, for their assistance with the necropsies of animals, specially to E. Ferrer, J. Tomás, M. Fernández and M. Masiá for their carefully work with the viscera analysis. Thanks are also due to J. A. Balbuena, C. Blanco, M. Domingo, A. Kostadinova, F. E. Montero and A. Raduán for their comments and assistance. Cetaceans were collected, thanks to an agreement between the Conselleria de Territorio y Vivienda (Generalitat Valenciana) and the University of Valencia. This work has been supported by projects GV04B304 from the Generalitat Valenciana and REN2003-01758 from the Spanish Government. F.J.A. benefits from a “Ramón y Cajal” contract from the MCYT of Spain. C.A. holds a doctoral fellowship from the Conselleria de Cultura, Educació i Ciencia of the Generalitat Valenciana. PDO and DTJL were supported in part by the Wellcome Trust (043965/Z/95/Z).

References

- Abollo, E., López, A., Gestal, C., Benavente, P., Pascual, S., 1998. Macroparasites in cetaceans stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 32, 227-231.
- Agustí, C., Aznar, F.J., Raga, J.A., 2005a. Tetraphyllidean plerocercoids from western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: a comprehensive morphological analysis. *J. Parasitol.* 91, 83-92.
- Agustí, C., Aznar F.J., Olson P.D., Littlewood, D.T.J., Kostadinova, A., Raga, J.A., 2005b. Morphological and molecular characterization of tetraphyllidean merocercoids (Platyhelminthes: Cestoda) of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Western Mediterranean. *Parasitology* 130, 461-474.

Alfaro, J., Van Waerebeek, K., Van Bresseem, M., Reyes, J., 1994. Parásitos de *Delphinus capensis* en el Pacífico suroriental. In: Ximenez, A., Simoes-Lopes, P.C., (Eds.), Anais da 6ª reunião de trabalho de especialistas em mamíferos aquáticos da América do Sul. Book of Abstracts. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología, p. 80.

Aznar, F.J., Balbuena, J.A., Raga, J.A., 1994. Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian waters. Can. J. Zool. 72, 702-706.

Berta, A., 2002. Pinniped evolution. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M. (Eds.), Encyclopedia of marine mammals. Academic Press, San Diego, pp. 921-929.

Best, P.B., Abernethy, R.B., 1994. Heaviside's dolphin *Cephalorhynchus heavisidii* (Gray, 1828). In: Ridgway, S.H., Harrison, S.R. (Eds.), Handbook of marine mammals, Vol 5. Academic Press, London, pp. 289-310.

Bester, M.N., 1989. Endoparasites of the subantarctic fur seal *Arctocephalus tropicalis* from Gough Island. S. Afr. J. Zool. 24, 363-365.

Brickle, P., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Bishop, A., Arkhipkin, A.I., 2001. Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. Can. J. Zool. 79, 2289-2296.

Brown, S.P., Renaud, F., Guégan, J.F., Thomas, F., 2001. Evolution of trophic transmission in parasites: the need to reach a mating place? J. Evol. Biol. 14, 815-820.

Brownell, R.L., 1989. Franciscana *Pontoporia blainvillei*. In: Ridgway, S.H., Harrison, S.R. (Eds.), Handbook of marine mammals, Vol. 4. Academic Press, London, pp. 45-68.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revised. J. Parasitol. 83, 575-583.

Caira, J.N., Reyda, F.B., 2005. Helminth parasites. Eucestoda (true tapeworms). In: Rohde, K. (Ed.), Marine parasitology. CAB International, Wallingford, pp. 92-104.

Colom-Llavina, M.M., 2005. Metazoan parasites of marine mammals from the Caribbean and the western coast of North America. Unpublished Master Thesis, Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.

Conover, W.J., 1999. Practical nonparametric statistics, 3rd Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Corcuera, J., Monzón, F., Aguilar, A., Borrell, A., Raga, J.A., 1995. Life history data, organochlorine pollutants and parasites from eight Burmeister's porpoises, *Phocoena spinipinnis*, caught in northern Argentine waters. In: Bjorge, A., Donovan, G.P. (Eds.), Biology of the phocoenids. Rep. Int. Whal. Commn. Special Issue 16, pp. 365-372.

Cortés, E., 1999. Standardized diet composition and trophic levels of sharks. ICES J. Mar. Sci. 56, 707-717.

Cowan, D.F., Smith, T.L., 1999. Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. J. Anat. 194, 505-517.

Chervy, L., 2002. The terminology of larval cestodes or metacestodes. Syst. Parasitol. 52, 1-33.

Dailey, M.D., 1971. Distribution of helminths in the Dall porpoise (*Phocoenoides dalli* True). J. Parasitol. 57, 1348.

Dailey, M.D., 1975. The distribution and intraspecific variation of helminth parasites in pinnipeds. Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer 169, 338-352.

Dailey, M.D., 1985. Diseases of mammalia: Cetacea. In: Kinne, O. (Ed.), Diseases of marine animals, Vol. IV, Part 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 805-847.

Dalebout, M.L., Mead, J.G., Baker, C.S., Baker, A.N., Van Helden, A.L., 2002. A new species of beaked whale *Mesoplodon perrini* sp. n. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analyses of mitochondrial DNA sequences. Mar. Mam. Sci. 18, 577-608.

Delyamure, S.L., 1955. Helminth fauna of marine mammals (ecology and phylogeny). Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, Russia. (English translation by M. Raveh, 1968. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel).

Dollfus, R.P.H., 1964. A propos de la récolte, à Banyuls d'un cystique de Cestode chez *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Les cystiques des cestodes chez les cétacés et pinnipèdes. Vie Milieu 17, 177-204.

Evans, P.G.H., Raga, J.A., 2001. Marine mammals biology and conservation. Plenum Publishers, New York.

Euzet, L., 1959. Recherches sur les cestodes tétraphyllides des sélaciens des côtes de France. Ph. D. Thesis, University of Montpellier.

Fergusson, I.K., 1996. Distribution and autecology of the white shark in the eastern North Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: Klimley, A.P., Ainley D.G. (Eds.), Great white sharks: the biology of *Carcharodon carcharias*. Academic Press, San Diego, pp. 321-345.

Fergusson, I.K., Compagno, L.J.V. and Marks, M.A., 2000. Predation by white sharks *Carcharodon carcharias* (Chondrichthyes: Lamnidae) upon chelonians, with new records from the Mediterranean Sea and a first record of the ocean sunfish *Mola mola* (Osteichthyes: Molidae) as stomach contents. Environ. Biol. Fishes 58, 447-453.

Fernández, M., Agustí, C., Aznar, F.J., Raga, J.A., 2003. Gastrointestinal helminths of Risso's dolphin *Grampus griseus* from the western Mediterranean. Dis. Aquat. Org. 55, 73-76.

Fordyce, R.E., 2002. Cetacean evolution. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M., (Eds.), Encyclopedia of marine mammals. Academic Press, San Diego. pp. 214-220.

Garippa, G., Scala, A., Pais, A., 1991. *Phyllobothrium delphini* and *Pennella* sp. in a dolphin of the species *Stenella coeruleoalba*. Boll. Soc. It. Patol. Ittica 6, 19-24.

George-Nascimento, M.G., Carvajal, J., 1981. Helmintos parásitos del lobo marino común *Otaria flavescens* en el Golfo de Arauco, Chile. Bol. Chile. Parasit. 36, 72-73.

Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., 1987. Effects of parasites on marine mammals. Int. J. Parasitol. 17, 407-414.

Geraci, J.R., Lounsbury, V.J., 1993. Marine mammals ashore. A field guide for strandings. Texas A&M University Sea Grant College Program, Galveston, Texas.

Gibson, D.I., Harris, E.A., Bray, R.A., Jepson, P.D., Kuiken, T., Baker, J.R., Simpson, V.R., 1998. A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990-1994. *J. Zool.* 244, 563-574.

Heithaus, M.R., 2001. Predator-prey and competitive interactions between sharks (order Selachii) and dolphins (suborder Odontoceti): a review. *J. Zool.* 253, 53-68.

Hoberg, E.P., Gardner, S.L., Campbell, R.A., 1999. Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Syst. Parasitol.* 42, 1-12.

Hoelzel, A.R., Potter, C.W., Best, P.B., 1998. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1177-1183.

Jefferson, T.A., Curry, B.E., 2003. *Stenella clymene*. *Mammalian Species* 726, 1-5.

Johnston, T.H., Mawson, P.M., 1939. Internal parasites of the pigmy sperm whale. *Rec. S. Aust. Mus.* 6, 263-274.

Kuramochi, T., Kikuchi, T., Okamura, H., Tatsukawa, T., Doi, H., Nakamura, K., Yamada, T.K., Koda, Y., Yoshida, Y., Matsuura, M., Sakakibara, S., 2000. Parasitic helminth and epizoot fauna of finless porpoise in the Inland Sea of Japan and the western North Pacific with a preliminary note on faunal difference by host's local population. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* 33, 83-95.

Lauckner, G., 1985. Diseases of mammalia: Pinnipedia. In: Kinne, O. (Ed.), *Diseases of marine animals*, Vol. IV, Part 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 683-793.

Long, D.J., Jones, R.E., 1996. White shark predation and scavenging on cetaceans in the eastern north Pacific Ocean. In: Klimley, A.P., Ainley D.G., (Eds.), *Great white sharks: the biology of *Carcharodon carcharias**. Academic Press, San Diego, pp. 293-307.

Maddison, D.R., Maddison, W.P., 2000. *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution*. Ver. 4.06. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.

Machida, M., 1974. Helminth parasites of the True's porpoise, *Phocoenoides truei* Andrews. *Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo* 17, 221-227.

- Marques, J., Santos, M.J., Gibson, D.I., Cabrali, H.N., Olson, P.D., *submitted*. Cryptic species of *Didymobothrium rudolphii* in the sand sole, *Solea lascaris*, off the coast of Portugal with analysis of their molecules, morphology, ultrastructure. *Parasitol.*
- Martin, R.A., Hammerschlag, N., Collier, R.S., Fallows, C., 2005. Predatory behaviour of white sharks (*Carcharodon carcharias*) at Seal Island, South Africa. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 85, 1121-1135.
- McAlpine, D.F., Murison, L.D., Hoberg, E.P., 1997. New records for the pygmy sperm whale, *Kogia breviceps* (Physeteridae) from Atlantic Canada with notes on diet and parasites. *Mar. Mam. Sci.* 13, 701-704.
- McColl, K.A., Obendorf, D.L., 1982. Helminth parasites and associated pathology in stranded Fraser's dolphins, *Lagenodelphis hosei* (Fraser, 1956). *Aquatic Mammals* 9, 30-34.
- Mead, J.G., 1989. Beaked whales of the genus *Mesoplodon*. In: Ridgway, S.H., Harrison, S.R. (Eds.), *Handbook of marine mammals*, Vol. 4. Academic Press, pp. 349-430.
- Measures, L.N., Béland, P., Martineau, D., De Guise, S., 1995. Helminths of an endangered population of belugas, *Delphinapterus leucas*, in the St. Lawrence estuary, Canada. *Can. J. Zool.* 73, 1402-1409.
- Melo, O.P., Ramos, R.M.A., Di Benedetto, A.P.M., 2006. Helminths of the marine tucuxi, *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Cetacea: Delphinidae), in northern Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Arch. Bio. Tech.* 49, 145-148.
- Mignucci-Giannoni, A.A., Hoberg, E.P., Siegel-Causey, D., Williams, E.H.Jr., 1998. Metazoan parasites and other symbionts of cetaceans in the Caribbean. *J. Parasitol.* 84, 939-946.
- Norman, R.J.de B., 1997. Tetraphyllidean cysticerchi in the peritoneal cavity of the common dolphin. *J. Wildl. Dis.* 33, 891-895.
- Nylander, J., 2002. MrModeltest Version 1.1b. Department of Systematic Zoology, EBC, Uppsala, Sweden.
- Olson, P.D., Tkach, V.V., 2005. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic

Platyhelminthes. Adv Parasitol.

Olson, P.D., Ruhnke, T.R., Sanney, J., Hudson, T., 1999. Evidence for host-specific clades of tetraphyllidean tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda) revealed by analysis of 18S ssrDNA. Int J Parasitol 29, 1465-1476.

Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Griffiths, D., Kennedy, C.R., Arme, C., 2002. Evidence for the co-existence of separate strains or species of *Ligula* in Lough Neagh, Northern Ireland. J Helminthol 76, 171-174.

Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int. J. Parasitol. 33, 733-755.

Parker, G.A., Chubb, J.C., Ball, M.A., Roberts, G.N., 2003a. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. Nature 425, 480-484.

Parker, G.A., Chubb, J.C., Roberts, G.N., Michaud, M., Milinski, M., 2003b. Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. J. Evol. Biol. 16, 47-54.

Parsons, E.C.M., Jefferson, T.A., 2000. Post-mortem investigations on stranded dolphins and porpoises from Hong Kong waters. J. Wildl. Dis. 36, 342-356.

Parsons, E.C.M., Overstreet, R.M., Jefferson, T.A., 2001. Parasites from Indo-Pacific hump-backed dolphins (*Sousa chinensis*) and finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) stranded in Hong Kong. Vet. Rec. 148, 776-780.

Perrin, W.F., 1998. *Stenella longirostris*. Mammalian Species 599, 1-7.

Perrin, W.F., 2001. *Stenella attenuata*. Mammalian Species 683, 1-8.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.

Raga, J.A., 1992. Parasitismus bei den Pinnipedia. In: Duguy, R., Robineau, D. (Eds.), Handbuch der säugetiere europas, band 6/II meeressäuger, teil II: robben, Pinnipedia. Aula-Verlag Wiesbaden, pp. 41-75.

Raga, J.A., 1994. Parasitismus bei den Cetacea. In: Robineau, D., Duguy, R., Klima, M. (Eds.), *Handbuch der säugetiere europas, band 6/I A meeressäuger, teil I A: wale und delphine*, 1, Cetacea. Aula-Verlag Wiesbaden, pp. 132-179.

Raga, J.A., Aznar, F.J., Balbuena, J.A., Fernández, M., 2002. Parasites. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M. (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, San Diego, pp. 867-876.

Rauch, G., Kalbe, M., Reusch, T.B.H., 2005. How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *J. Evol. Biol.* 18, 1069-1075.

Reyda, F., Olson, P.D., 2003. Cestodes of cestodes of Peruvian freshwater stingrays. *J. Parasitol.* 89, 1018-1024.

Rice, D.W., 1977. Synopsis of biological data on the Sei Whale and Bryde's whale in the eastern North Pacific. *Rep. Int. Whal. Commn. Special Issue 1*, 92-97.

Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1981a. *Handbook of marine mammals, Vol. 1: The walrus, sea lions, fur seals and sea otter*. Academic Press, London.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1981b. *Handbook of marine mammals, Vol. 2: Seals*. Academic Press, London.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1985. *Handbook of marine mammals, Vol. 3: The sirenians and baleen whales*. Academic Press, London.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1989. *Handbook of marine mammals, Vol. 4: River dolphins and the larger toothed whales*. Academic Press, London.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1994. *Handbook of marine mammals, Vol. 5: The first book of dolphins*. Academic Press, London.

Ridgway, S.H., Harrison, S.R., 1999. *Handbook of marine mammals, Vol. 6: The second book of dolphins and the porpoises*. Academic Press, San Diego.

- Rogan, E., Baker, J.R., Jepson, P.D., Berrow, S., Kiely, O., 1997. A mass stranding of white-sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) in Ireland: biological and pathological studies. *J. Zool.* 242, 217-227.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G., 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J. Parasitol.* 86, 228-232.
- Ruhnke, T.R., 1993. A new species of *Clistobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea), with an evaluation of the systematic status of the genus. *J. Parasitol.* 79, 37-43.
- Santos, C.P., Rohde, K., Ramos, R., Di Benedetto, A.P., Capistrano, L., 1996. Helminths of cetaceans on the southeastern coast of Brazil. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 63, 149-152.
- Siquier, G.F., Le Bas, A.E., 2003. Morphometrical categorization of *Phyllobothrium delphini* (Cestoidea, Tetraphyllidea) cysts from Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei* (Cetacea, Delphinidae). *LAJAM* 2, 95-100.
- Simpson, J.G., Gardner, M.B., 1972. Comparative microscopic anatomy of selected marine mammals. In: Ridgway, S.H. (Ed.), *Mammals of the sea. Biology and medicine*. C.C. Thomas Publisher, Springfield, pp. 298-418.
- Skrjabin, A.S., 1970. The first finding of larvae of the cestode *Monorygma delphini* (Tetraphyllidea, Phyllobothriidae) in Antarctic whales. *Zool. Zh.* 49, 1721-1722 [in Russian].
- Skrjabin, A.S., 1972. Larvae of cestodes of the genus *Phyllobothrium* Van Beneden, 1850 (Tetraphyllidea), parasites of whales and other marine animals. *Parazitologiya* 6, 426-434 [in Russian].
- Slooten, E., Dawson, S.M., 1994. Hector's dolphin *Cephalorhynchus hectori* (Van Beneden, 1881). In: Ridgway, S.H., Harrison, S.R. (Eds.), *Handbook of marine mammals*, Vol. 5. Academic Press, pp. 311-334.
- Soares, M.L.R., 1986. Ocorrência de *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) Gervais, 1882 (Phyllobothriidae: Cestoda) em lobos marinho *Arctocephalus australis* Zimmerman, 1783 e

Arctocephalus tropicalis Gray, 1872 (Pinnipedia: Otariidae) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Anais da 2ª reuniao de trabalho de especialistas em mamíferos aquáticos da América do Sul. Book of Abstracts. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza, Brasil, p. 21.

Southwell, T., Walker, A.J., 1936. Notes on a larval cestode from a fur seal. Ann. Trop. Med. Parasitol. 30, 91-100.

Swofford, D.L., 2001. Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other Methods). Vers. 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Testa, J., Dailey, M.D., 1977. Five new morphotypes of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Tetraphyllidae), their relationship to existing morphotypes, and their zoogeography. Bull. South. Calif. Acad. Sci. 76, 99-110.

Threlfall, W., 1970. Some helminth parasites from *Illex argentinus* (de Castellanos, 1960) (Cephalopoda: Ommastrephidae). Can. J. Zool. 48, 195-198.

Tkach, V.V., Littlewood, D.T.J., Olson, P.D., Kinsella, J.M., Swiderski, Z., 2003. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). Syst Parasitol 56, 1-15.

Uchida, A., Kawakami, Y., Yuzu, S., Kishikawa, S., Kuramochi, T., Araki, J., Machida, M., Nagasawa, K., 1998. Prevalence of parasites and histopathology of parasitisation in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) from the western North Pacific ocean and the southern sea of Okhotsk. Rep. Int. Whal. Commn. 48, 475-479.

Walker, W.A., 1981. Geographical variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (Tursiops) in the eastern North Pacific. NOAA, NMFS, SWFC Admin. Rep. LJ-81-03C.

Walker, W.A., 2001. Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the Northern North Pacific, Bering Sea and Sea of Okhotsk. Mar. Mam. Sci. 17, 264-275.

Van Waerebeek, K., Reyes, J.C., Read, A.J., McKinnon, J.S., 1990. Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America. In: Leatherwood, S., Reeves, R.R. (Eds.), The bottlenose dolphin. Academic Press, San Diego, pp.143-154.

Van Waerebeek, K., Reyes J.C., Alfaro J., 1993. Helminth parasites and phoronts of dusky dolphins *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) from Peru. *Aquatic Mammals* 19, 159-169.

Williams, H.H., 1968. The taxonomy, ecology and host-specificity of some Phyllobothriidae (Cestoda: Tetraphyllidea), a critical revision of *Phyllobothrium* Beneden, 1849 and comments on some allied genera. *Phil. Trans. Royal Soc. London, Series B, Biological Sciences* 786 (253), 231-307.

Williams, T.M., Haun, J., Davis, R.W., Fuiman, L.A., Kohin, S., 2001. A killer appetite: metabolic consequences of carnivory in marine mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 129, 785-796.

Wojciechowska, A., 1993. The tetraphyllidean and tetrabothriid cercoids from Antarctic bony fishes. I. Morphology. Identification with adult forms. *Acta Parasitol.* 38, 15-22.

Table 1. Number of individuals of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* (Sc), Risso's dolphins, *Grampus griseus* (Gg) and bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Tt) used for analysis of infection patterns of tetraphyllidean larvae. The Intensity Index is described in Material and Methods.

Host species	Larval type	Presence/absence	Intensity Index
Sc	<i>Phyllobothrium</i>	50	10
	<i>delphini</i>		
	<i>Monorygma grimaldii</i>	50	10
	LP*	50	20
	SP	15 (stomach)	15 (stomach)
		50 (intestine, bile ducts)	20 (intestine, bile ducts)
Gg	All larval types	8	8
Tt	All larval types	4	4

*LP: 'large' plerocercoid; SP: 'small' plerocercoid.

Table 2. Host and microhabitats of specimens used for molecular analysis.

Larval type	<i>Phyllobothrium delphini</i>	<i>Monorygma grimaldii</i>	Large 'Scolex pleuronectis' (LP)		Small 'Scolex pleuronectis' (SP)
Microhabitat	blubber	mesentery	anal canal	liver	terminal colon
Host					
<i>Stenella</i>	8*	8*	8 [†]	3	1
<i>coeruleoalba</i>	AY741599-606 BMNH 2004.8.18.6-13	AY741591-598 BMNH 2004.8.18.14-21	Sc1-PGA (DQ839574/BMNH.2004.10.13.14) Sc1-PGB (DQ839575/BMNH.2004.10.13.15) Sc1-PGC (DQ839576/BMNH.2004.10.13.16) Sc2-PG2 (DQ839577/BMNH.2004.10.13.17) Sc2-PG4 (DQ839570/BMNH.2004.10.13.18) Sc2-PG6 (DQ839571/BMNH.2004.10.13.19) Sc3-PGA (DQ839578/BMNH.2004.10.13.20) Sc3-PGB (DQ839579/BMNH.2004.10.13.21)	Sc4-PGD (DQ839569/ BMNH.2006.8.17.1) Sc25-PGA (DQ839568/ BMNH.2004.10.13.22) Sc25-PGB (DQ839572/ BMNH.2004.10.13.23)	Sc3-PPA (DQ839588/ BMNH.2004.10.13.25)
<i>Grampus</i>	2	2	1		1
<i>griseus</i>	Gg1-PdA (DQ839593/BMNH.2004.10.13.4) Gg1-PdB (DQ839589/BMNH.2004.10.13.5)	Gg1-MgC (DQ839585/BMNH.2004.10.13.9) Gg1-MgD (DQ839586/BMNH.2004.10.13.10)	Gg1-PG2 (DQ839573/BMNH.2004.10.13.13)		Gg1-PP2 (DQ839587/ BMNH.2004.10.13.24)
<i>Tursiops</i>	3	3	2		
<i>truncatus</i>	Tt1-PdA (DQ839590/BMNH.2004.10.13.1) Tt1-PdB (DQ839591/BMNH.2004.10.13.2) Tt1-PdC (DQ839592/BMNH.2004.10.13.3)	Tt1-MgA (DQ839582/BMNH.2004.10.13.6) Tt1-MgB (DQ839583/BMNH.2004.10.13.7) Tt1-MgC (DQ839584/BMNH.2004.10.13.8)	Tt1-PGA (DQ839580/BMNH.2004.10.13.11) Tt1-PGC (DQ839581/BMNH.2004.10.13.12)		
TOTAL	13	13	14		2

* Previously published samples: see Agusti *et al.*, 2005b for additional information.

[†] No. of each larval type; sample code (GenBank Acc. No./Voucher Acc. No.)

Table 3. Data on prevalence and intensity index (INI: see Materials and Methods) of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii* in three dolphin species from the Western Mediterranean (abbreviated as in Table 1). Prevalences are expressed as percentages with the 95% confidence interval in parentheses. The INI is expressed by the median value, with the range in parentheses.

Host	Sc		Gg		Tt	
Larval type	<i>P. delphini</i>	<i>M. grimaldii</i>	<i>P. delphini</i>	<i>M. grimaldii</i>	<i>P. delphini</i>	<i>M. grimaldii</i>
Prevalence	100.0 (92.5-100.0)	96.0 (86.3-99.3)	50.0 (19.3-80.7)	87.5 (50.0-99.4)	75.0 (24.9-98.7)	75.0 (24.9-98.7)
INI	3 (2-3)	2 (2-3)	1	1 (1-2)	1	1 (1-2)

Table 4. Data on prevalence of ‘small’ (SP) and ‘large’ (LP) plerocercoids in three dolphin species from the Western Mediterranean (abbreviated as in Table 1). Prevalences are expressed as percentages with the 95% confidence interval in parentheses. Sample size for each site is shown in Table 1.

Larval type	Host	Site					
		Stomach			LPD	Intestine	
		FS*	MS	PS		I(1-19)	I(20)
SP	Sc	-	13.3	100	-	52.0	94.0
			(2.4-39.7)	(77.8-100.0)		(37.9-66.1)	(83.3-98.3)
	Gg	-	-	50.0	-	62.5	75.0
LP	Tt	-	-	(19.3-80.7)	-	(28.9-88.9)	(36.5-95.4)
			25.0	50.0		NA [†]	75.0
	Sc	-	(1.3-75.1)	(9.8-90.2)	-	(24.9-98.7)	
LP	Sc	4.0	2.0	14.0	92.0	58.0	100.0
			(0.7-13.7)	(0.1-10.7)	(6.7-26.8)	(81.2-97.2)	(44.0-71.2)
	Gg	-	-	-	37.5	12.5	75.0
LP	Tt	-	-	-	(11.1-71.1)	(0.6-50.0)	(36.5-95.4)
	Tt	-	-	-	-	NA	75.0
LP	Sc	4.0	2.0	14.0	92.0	58.0	100.0
			(0.7-13.7)	(0.1-10.7)	(6.7-26.8)	(81.2-97.2)	(44.0-71.2)
	Gg	-	-	-	37.5	12.5	75.0
LP	Tt	-	-	-	(11.1-71.1)	(0.6-50.0)	(36.5-95.4)
	Tt	-	-	-	-	NA	75.0

* FS, forestomach; MS, main stomach; PS, pyloric stomach; LPD, liver, pancreas and hepatopancreatic duct; I(1-19), intestine (sections 1 to 19); I(20), intestine (section 20);

[†] NA: Organ not available.

Table 5. Data on intensity index (INI) (see Materials and Methods) of ‘small’ (SP) and ‘large’ (LP) plerocercoids in three dolphin species from the Western Mediterranean (abbreviated as in Table 1). The INI is expressed by the median value, with the range in parentheses. Sample size for each site is shown in Table 1.

Host	Larval type	Site					
		Stomach			LPD	Intestine	
		FS*	MS	PS		I(1-19)	I(20)
SP	Sc	-	(1-2)	3 (2-3)	-	2 (1-4)	3 (2-4)
	Gg	-	-	2	-	2 (1-2)	2 (1-4)
	Tt	-	1	3	-	NA [†]	3
LP	Sc	1	2	1 (1-2)	2 (1-3)	1 (1-2)	3 (2-4)
	Gg	-	-	-	1 (1-2)	1	2 (1-3)
	Tt	-	-	-	-	NA	(2-3)

* FS, forestomach; MS, main stomach; PS, pyloric stomach; LPD, liver, pancreas and hepatopancreatic duct; I(1-19), intestine (sections 1 to 19); I(20), intestine (section 20).

[†] NA: Organ not available.

Table 6. Reports of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii* in cetaceans and pinnipeds worldwide.

Host family	Host species		
	Not sufficiently analysed	Accidental	Common
Cetacea			
Mysticeti [†]			
Balaenidae	Euj [†]	Eua, Eug, Bm	-
Eschrichtidae	-	Esr	-
Balaenopteridae	Bpbn, Bpe	Bpa, Bpm, Bpp, Mn	Bpbr
Neobalaenidae	Cm	-	-
Odontoceti			
Physeteridae	-	-	Pm
Kogiidae	-	-	Kb, Ks
Ziphiidae	All except 3 species	-	Zc, Mee, Mem
Monodontidae	Mom	DI	-
Delphinidae	Ce, Det, Lrau, Lrcr, Lip, Ob, Pee, Psc, Sop, Sot, Seb, Stf, Ta	Cc, Lral, Slf, Soc	Dec, Ded, Fa, Glma, Glme, Gg, Ldh, Lrac, Lrol, Lros, Chv, Chc, Lib, Oo, Sta, Stcl, Stco, Stl, Tt
Phocoenidae	Phd, Phsi	Np, Php, Phsp	Pdd
Pontoporidae	-	Pb	-
Carnivora			
Pinnipedia			
Otaridae	Atw, Ap	All except 3 species	Otb, Aa, Atr,
Odobenidae	-	Odr	-
Phocidae	Omr, Ps, Mm	All except 1 species	MI

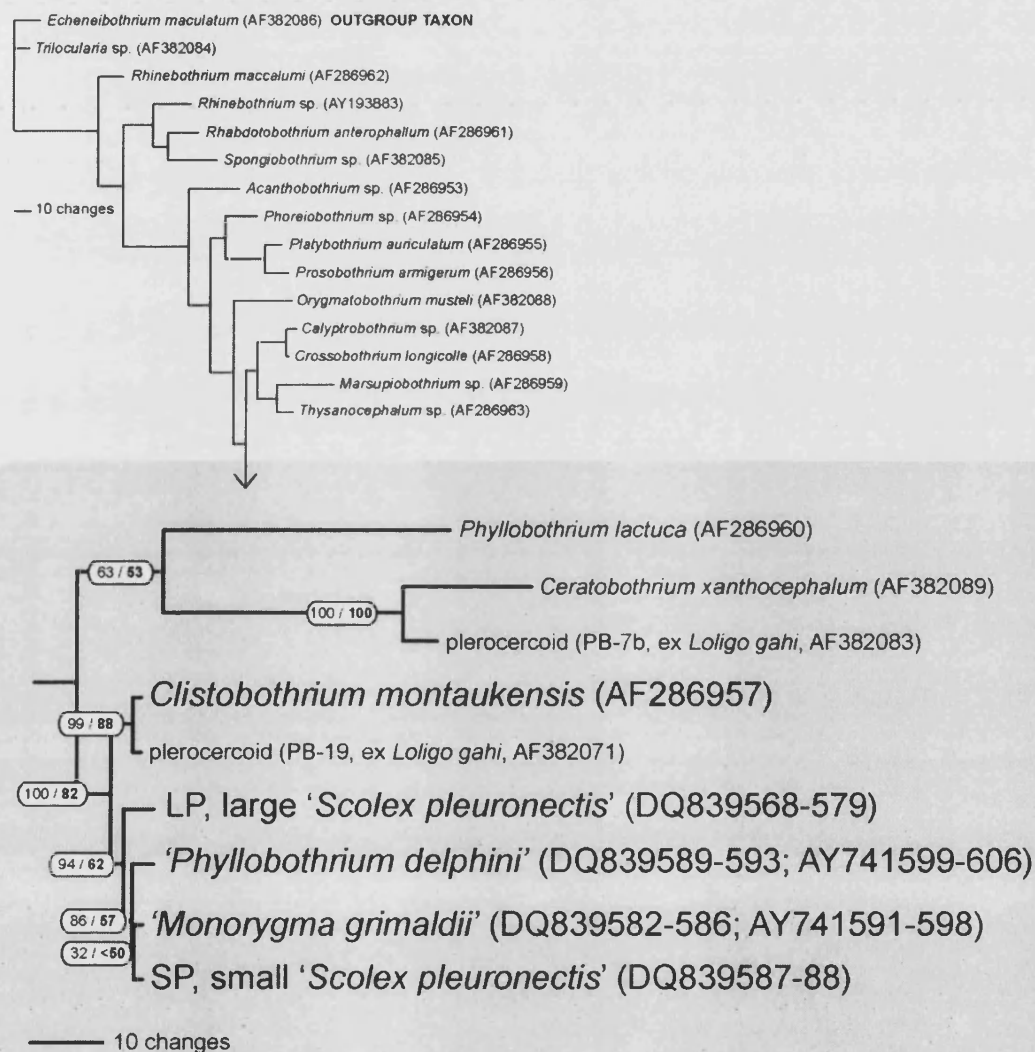
[†] References for Mysticeti: Skrjabin (1970, 1972), Rice (1977), Raga (1994), Uchida *et al.* (1998).
References for Odontoceti: Delyamure (1955), Williams (1968), Dailey (1971), Skrjabin (1972), Machida (1974), Testa and Dailey (1977), Brownell (1989), Mead (1989), Van Waerebeek *et al.* (1993), Alfaro *et al.* (1994), Aznar *et al.* (1994), Best and Abernethy (1994), Raga (1994), Slooten and Dawson (1994), Corcuera *et al.* (1995), Measures *et al.* (1995), Santos *et al.* (1996), McAlpine *et al.* (1997), Rogan *et al.* (1997), Abollo *et al.* (1998), Gibson *et al.* (1998), Mignucci-Giannoni *et al.* (1998), Perrin (1998), Kuramochi *et al.* (2000), Parsons and Jefferson (2000), Parsons *et al.* (2001), Perrin (2001), Walker (2001), Jefferson and Curry (2003), Siquier and Le Bas (2003), Colom-Llavina (2005), Melo *et al.* (2006), Berón-Vera (personal communication). References for Pinnipedia: Dailey

(1975), George-Nascimento and Carvajal (1981), Lauckner (1985), Soares (1986), Bester (1989), Raga (1992).

† Abbreviations for host species: Aa, *Arctocephalus australis*; Ap, *A. philippii*; Atr, *A. tropicalis*; Atw, *A. townsendi*; Bm, *Balaena mysticetus*; Bpa, *Balaenoptera acutorostrata*; Bpbn, *B. bonaerensis*; Bpbr, *B. borealis*; Bpe, *B. edeni*; Bpm, *B. musculus*; Bpp, *B. physalus*; Cc, *Cephalorhynchus commersonii*; Ce, *C. eutropia*; Chc, *C. hectori*; Chv, *C. heavisidii*; Cm, *Caperea marginata*; Dec, *Delphinus capensis*; Ded, *D. delphis*; Det, *D. tropicalis*; Dl, *Delphinapterus leucas*; Esr, *Eschrichtius robustus*; Eua, *Eubalaena australis*; Eug, *E. glacialis*; Euj, *E. japonica*; Fa, *Feresa attenuata*; Gg, *Grampus griseus*; Glma, *Globicephala macrorhynchus*; Glme, *G. melas*; Kb, *Kogia breviceps*; Ks, *K. simus*; Ldh, *Lagenodelphis hosei*; Lib, *Lissodelphis borealis*; Lip, *L. peronii*; Lrac, *Lagenorhynchus acutus*; Lral, *L. albirostris*; Lrau, *L. australis*; Lrcr, *L. cruciger*; Lrol, *L. obliquidens*; Lros, *L. obscurus*; Mee, *Mesoplodon europaeus*; Mem, *M. mirus*; Ml, *Mirounga leonina*; Mm, *Monachus monachus*; Mn, *Megaptera novaeangliae*; Mom, *Monodon monoceros*; Np, *Neophocaena phocaenoides*; Ob, *Orcaella brevirostris*; Odr, *Odobenus rosmarus*; Omr, *Ommatophoca rossi*; Oo, *Orcinus orca*; Otb, *Otaria byronia*; Pb, *Pontoporia blainvillei*; Pdd, *Phocoenoides dalli*; Pee, *Peponocephala electra*; Phd, *Phocoena dioptrica*; Php, *P. phocoena*; Phsi, *P. sinus*; Phsp, *P. spinipinnis*; Pm, *Physeter macrocephalus*; Ps, *Phoca sibirica*; Psc, *Pseudorca crassidens*; Seb, *Steno bredanensis*; Slf, *Sotalia fluviatilis*; Soc, *Sousa chinensis*; Sop, *S. plumbea*; Sot, *S. teuszii*; Sta, *Stenella attenuata*; Stcl, *S. clymene*; Stco, *S. coeruleoalba*; Stf, *S. frontalis*; Stl, *S. longirostris*; Ta, *Tursiops aduncus*; Tt, *T. truncatus*; Zc, *Ziphius cavirostris*.

Legend to Figures

Fig. 1. Phylogenetic position of the larval tetraphyllideans based on Bayesian inference of the D2 region *lsrDNA* (515 characters); clade containing larval taxa enlarged to illustrate short internal branch lengths. Nodal support shown as posterior probabilities / bootstrap percentages (bold). Relative branch lengths based on Bayesian inference with scale showing absolute character differences. GenBank sequence accession numbers are shown parenthetically.





RESULTADOS GLOBALES Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS GLOBALES Y DISCUSIÓN

Durante el examen parasitológico de las cuatro especies de cetáceos objeto de estudio se detectaron tres tipos de larvas de cestodos tetrafilídeos. Dos merocercoides, identificados como *P. delphini* y *M. grimaldii*, se encontraron enquistados en la grasa subcutánea y en el peritoneo y mesenterios de la cavidad abdominal, respectivamente, del delfín listado, delfín mular y calderón gris. Además, se encontraron diversos plerocercoides en el tracto digestivo de todas las especies de cetáceos analizadas, y en los conductos hepáticos y pancreáticos del delfín listado y el calderón gris.

Pero, ¿cuántos morfotipos están parasitando realmente a los cetáceos del Mediterráneo occidental?

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MORFOTIPOS BÁSICOS:

5.1.1. PLEROCERCOIDES:

5.1.1.1. *Estudio de la morfología general*

Todos los plerocercoides tetrafilídeos detectados en las 4 especies de cetáceos presentaron la misma morfología, independientemente de la especie hospedadora y de la localización dentro del hospedador: cuerpo con forma lanceolada y escólex con una ventosa apical y 4 botridios sésiles y monoloculares, cada uno de ellos con una ventosa accesoria anterior (Figura 3 del capítulo 4.1). Los plerocercoides de otros hospedadores y otras localidades geográficas que no estaban descritos (Tabla 1 del capítulo 4.1) presentaron la misma morfología.

Sin embargo, y como mencionamos en la introducción, entre los plerocercoides de mamíferos marinos descritos en la literatura se encontraron dos morfologías: unos similares a los descritos en el presente trabajo (morfotipo II) (Stossich, 1898; Skrjabin, 1972), y otros que poseían un escólex con una ventosa apical y 4 botridios biloculares sin ventosa accesoria (morfotipo I) (Skrjabin, 1972; Skrjabin y Yurakhno, 1987). En general, los plerocercoides de tipo I presentaban un tamaño muy pequeño, por lo que el análisis detallado de la morfología del botridio debió ser complicado. De hecho, Avdeeva y Avdeev (1980, 1989) sugirieron que Skrjabin (1972) y Skrjabin y Yurakhno (1987) podrían haber interpretado erróneamente la morfología del botridio. Basándose en el estudio histológico del escólex de multitud de larvas de tetrafilídeos, Avdeeva y Avdeev (1980, 1989) apreciaron que algunos plerocercoides en un estado temprano de desarrollo parecían tener botridios biloculares sin ventosa accesoria, pero cuando realizaron cortes seriados del escólex

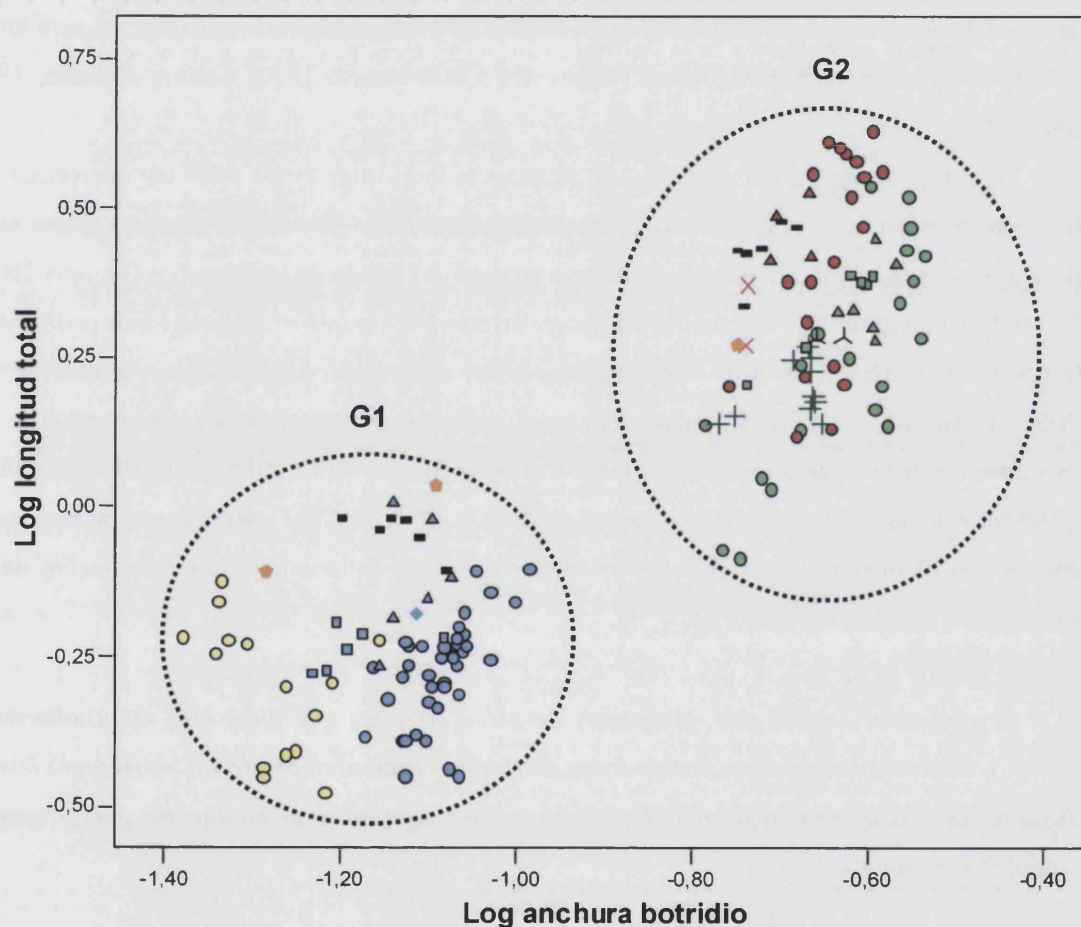
vieron que en realidad se trataba de botridios monoloculares con ventosa accesoria. En un análisis preliminar de las larvas más pequeñas encontradas en los cetáceos del Mediterráneo del presente estudio, nosotros también interpretamos la morfología del botridio como bilocular (Aznar *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando realizamos cortes histológicos de los mismos observamos una membrana que claramente separaba el supuesto lóbulo anterior del resto del tejido del botridio (Figura 4 del capítulo 4.1), por lo que en realidad se trataba de una ventosa accesoria (Avdeeva y Avdeev, 1989). No pudimos obtener el material descrito por Skrjabin (1972) o Skrjabin y Yurakhno (1987), pero a partir de los datos de Avdeeva y Avdeev (1980, 1989) y a nuestras propias observaciones, pensamos que los plerocercoides descritos por estos autores como biloculares, correspondían en realidad a plerocercoides con botridios monoloculares y ventosa accesoria.

Por tanto, existe una uniformidad morfológica en todos los plerocercoides hallados hasta la fecha en los mamíferos marinos.

5.1.1.2. *Estudio morfométrico*

Un análisis de componentes principales de todos los plerocercoides, tanto los presentes en los cetáceos mediterráneos como los citados en la bibliografía (Stossich, 1898; Skrjabin, 1972; Forrester *et al.*, 1980; Skrjabin y Yurakhno, 1987; McAlpine *et al.*, 1997; Aguilar-Aguilar *et al.*, 2001), reveló la existencia de dos grupos bien diferenciados a lo largo del primer componente principal, independientemente de la especie hospedadora y de la localidad geográfica (Figura 5 del capítulo 4.1). Estas diferencias se interpretaron como variación de tamaño y forma relacionada con el tamaño. Así pues, utilizamos las denominaciones ‘pequeño’ (para G1) y ‘grande’ (para G2) para distinguir ambos grupos. Las variables que mejor separaron ambos grupos fueron, en primer lugar, la anchura del botridio, y en segundo lugar, la longitud total del plerocercoides (Figura 5). Se encontraron individuos de ambos grupos en el mismo individuo hospedador en las 4 especies de cetáceos objeto de estudio. En la Figura 5 se muestran los microhábitats de donde provenían los plerocercoides empleados en el análisis.

Figura 5. Gráfico de dispersión del logaritmo de la longitud total frente al logaritmo de la anchura del botridio de 153 plerocercoides tetrafilídeos hallados en 9 especies de mamíferos marinos. Especímenes del estómago pilórico de *Stenella coeruleoalba* (●), colon terminal y recto de *Stenella coeruleoalba* (●), *Tursiops truncatus* (■) y *Grampus griseus* (▲); el estómago y duodeno de *Physeter macrocephalus* (◆); las criptas anales de *Z. cavirostris* (■); el intestino grueso de *Callorhinus ursinus* (◆); las criptas anales de *S. coeruleoalba* (●), *T. truncatus* (■) y *G. griseus* (▲); conductos hepatopancreáticos de *S. coeruleoalba* (●) y *G. griseus* (▲); el duodeno de *Kogia breviceps* (+); el hígado de *Feresa attenuata* (×), y el intestino de *Stenella longirostris* (⋈). Abreviaturas: G1, plerocercoide ‘pequeño’; G2, plerocercoide ‘grande’.



5.1.1.3. *Estudio de las estructuras tegumentales*

El tegumento de los dos tipos de plerocercoides ('pequeño' y 'grande') está totalmente recubierto por microtricos. Se observaron dos tipos básicos: filitricos (microtricos filiformes), y espinitricos lanceolados de diferentes tamaños y morfologías (microtricos con forma de punta de lanza, algunos con una prolongación filiforme en la punta) (Figuras 2 y 3 del capítulo 4.3).

No se observaron diferencias ni en la morfología ni en la distribución de los microtricos entre especímenes del mismo tipo larvario ni dentro de cada región corporal. La distribución fue muy similar en ambos tipos de plerocercoides: cuerpo y escólex recubierto de espinitricos lanceolados de diferentes tamaños, excepto en la ventosa apical, donde sólo se encontraron filitricos (Figura 6 del capítulo 4.3). La morfología y patrón de distribución fueron relativamente similares a los de otros plerocercoides tetrafilídeos (Gabrion y Euzet-Sicard, 1979; Caira y Ruhnke, 1991; Khalil, 1995).

En el tegumento de los dos tipos de plerocercoides, y mezclados entre los microtricos, se observaron unas estructuras cilíndricas parecidas a cilios. Estas estructuras se encontraron en la ventosa apical, las ventosas accesorias y en la parte distal del lóbulo de los botridios (Figuras 2B, D-F, 3B, D, E del capítulo 4.3). Normalmente aparecieron solas, aunque en algunos casos podían estar rodeadas de 3-4 filitricos. En otros plerocercoides se han encontrado estructuras con una morfología externa similar y se les ha atribuido funciones sensoriales basándose en observaciones con microscopía electrónica de transmisión (Gabrion y Euzet-Sicard, 1979; Palm *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 1999). Además, estas estructuras aparecieron en las zonas del escólex que normalmente contactan con el sustrato. Por todo ello, tanto la morfología externa como la distribución de los cilios sugieren una función sensorial.

Resumiendo, existen dos morfotipos de plerocercoides que parasitan habitualmente a cetáceos, y más raramente, pinnípedos. Estos morfotipos presentan la misma morfología básica, incluyendo las estructuras tegumentales, pero pueden diferenciarse fácilmente por el tamaño ('pequeño' y 'grande').

5.1.2. MEROCERCOIDES:

5.1.2.1. *Detalles morfológicos controvertidos y nuevas aportaciones*

Como mencionamos en la introducción, existe cierta confusión en los términos empleados para nombrar las estructuras de la región apical del escólex de *P. delphini* y *M. grimaldii*, empleándose la mayoría de las veces el término ‘mizorrinco’ para referirse a ellas. Por este motivo, en este trabajo se describen en primer lugar dichas estructuras y se utilizan los términos propuestos por Caira *et al.* (1999) para denominarlas. La región apical del escólex de los dos tipos de merocercoides está externamente modificada como una estructura móvil con forma de domo, pero internamente su tejido es continuo con el del resto del escólex (Figuras 2 y 4 del capítulo 4.2). Por tanto, puede considerarse como una ‘modificación apical del escólex’. La estructura observada en el ápice del escólex es un ‘órgano apical’, ya que histológicamente se observó una línea divisoria entre esta estructura y el tejido circundante (Figuras 2 y 4 del capítulo 4.2).

La morfología general de los especímenes de *P. delphini* y *M. grimaldii* obtenidos en los cetáceos del Mediterráneo occidental concordó con las descripciones previas de estos merocercoides excepto en la estructura del órgano apical (Southwell y Walker, 1936; Johnston y Mawson, 1939; Dollfus, 1964; Skrjabin, 1964; Skrjabin, 1970, 1972; Testa y Dailey, 1977; Mendonça, 1984; Siquier y Le Bas, 2003). Este órgano mostró cierta variabilidad morfológica. En algunos individuos de *P. delphini* el órgano apical parece una copa colapsada, mientras que en otros sobresale hacia afuera y es más redondeado. Internamente, el órgano apical tiene forma de saco delimitado por una fina membrana muscular, y contiene células basófilas pero no fibras musculares radiales. El órgano apical de *M. grimaldii* tiene forma de copa en unos individuos y cónica o de botón en otros, e internamente es muy similar al órgano apical de *P. delphini*. Para explicar esta variabilidad es interesante señalar las observaciones de Hamilton y Byram (1974) sobre el desarrollo *in vitro* del plerocercoides del oncobótrido *Acanthobothrium* sp. Dichos autores encontraron cambios sustanciales en la estructura de la ventosa apical a lo largo del desarrollo hasta que desaparecía. Las diferentes morfologías que adquirió la ventosa apical durante el proceso de desaparición son muy similares a las observadas en los órganos apicales de *P. delphini* y *M. grimaldii* del presente estudio. Por ello, es muy probable que la variabilidad observada en el órgano apical de los merocercoides del presente estudio se deba al resultado del mismo proceso degenerativo. De hecho, la posibilidad de que la ventosa apical en *P. delphini* pudiera reabsorberse ya había sido sugerida previamente en la literatura (Southwell y Walker, 1936; Wardle y McLeod, 1952).

En 9 especímenes de *P. delphini* recogidos de un delfín listado se observó una proglotización incipiente a lo largo del filamento de invaginación. Los proglótides contenían los primordios genitales masculinos y femeninos (Figura 3 del capítulo 4.2), apreciándose claramente los testículos y diversas agrupaciones celulares que probablemente correspondían a los primordios del ovario, la vagina y el vaso deferente. Aunque las estructuras del escólex fueron algo mayores en los especímenes proglotizados (Tabla 1 del capítulo 4.2) y el órgano apical tuvo en todos los casos forma de domo, la morfología general del escólex de estos individuos fue muy similar a los ejemplares sin proglótides del mismo individuo hospedador. Si asumimos que el escólex de los especímenes proglotizados no cambia sustancialmente al llegar al hospedador definitivo (Freeman, 1973), podemos suponer que el escólex de todos los individuos de *P. delphini* poseen ya los caracteres del adulto. Y, puesto que *M. grimaldii* se encuentra en un estado de desarrollo similar a *P. delphini* (con morfología merocercóide), tampoco esperamos que su escólex cambie sustancialmente en el hospedador definitivo aunque no encontráramos individuos proglotizados.

5.1.2.2. Estudio de las estructuras tegumentales

Al igual que en los plerocercoides, el tegumento de *P. delphini* y *M. grimaldii* está recubierto por microtricos. Se observaron los tipos descritos para los plerocercoides más dos nuevos: filitricos, espinitricos lanceolados, espinitricos cónicos con dos proyecciones paralelas y pequeñas en la punta, y espinitricos cilíndricos coronados por 6-7 papilas pequeñas; los 2 últimos tipos no habían sido descritos hasta la fecha (Figuras 4 y 5 del capítulo 4.3).

No se observaron diferencias ni en la morfología ni en la distribución de los microtricos entre especímenes del mismo tipo larvario ni dentro de cada región corporal. Los filitricos y los espinitricos lanceolados fueron los microtricos más comunes; al igual que en los plerocercoides, los primeros se encontraron en el órgano apical y los segundos en las ventosas accesorias y la región proximal del lóbulo del botridio. Los microtricos de la región apical del escólex y la parte distal del lóbulo del botridio fueron los que más variabilidad mostraron entre los dos tipos de merocercoides y con los plerocercoides (Figura 6 del capítulo 4.3). En la región apical del escólex de *P. delphini* se observaron espinitricos lanceolados finos y alargados, mientras que en *M. grimaldii* los espinitricos lanceolados tuvieron la base ancha y estaban mezclados con filitricos. En la parte distal del lóbulo del botridio de *P. delphini* se observaron espinitricos cilíndricos coronados con 6-7 papilas mezclados con filitricos, mientras que en *M. grimaldii* esta región estaba cubierta por espinitricos cónicos con dos pequeñas prolongaciones en el ápice y mezclados con filitricos. En el filamento de invaginación de ambos merocercoides se encontraron filitricos.

En la superficie de las ventosas accesorias y la parte distal del lóbulo de los botridios se observaron, regularmente distribuidas, unas estructuras con forma de papila o 'botón' (Figuras 4I, 5E del capítulo 4.3). Cuando estas estructuras se examinaron a gran aumento, se vio que cada

‘botón’ estaba formado por un cilio de morfología muy similar a la de los plerocercoides, rodeado por multitud de filitricos (unos 30 en *M. grimaldii* y 100 en *P. delphini*) (Figuras 4F, J, 5F, H del capítulo 4.3). En otros metacestodos se han descrito papilas o ‘botones’ con estructuras muy similares a las descritas en el presente trabajo, atribuyéndoles funciones sensoriales basándose en estudios de microscopía electrónica de transmisión (Gabrion y Euzet-Sicard, 1979; Palm *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 1999). Al igual que ocurre en los plerocercoides, estas estructuras aparecieron en las zonas del escólex que normalmente contactan con el sustrato (ventosas accesorias y parte distal del lóbulo del botridio) por lo que es muy probable que tengan también funciones sensoriales.

RESUMEN MORFOLÓGICO:

Existen cuatro tipos morfológicos de larvas tetrafilídeas que parasitan los cetáceos del Mediterráneo occidental: P. delphini, M. grimaldii y plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’. Los dos merocercoides podrían representar especies distintas de acuerdo con las diferencias morfológicas del escólex y las estructuras tegumentales, y su estado de desarrollo sugiere que esta morfología no cambiará sustancialmente en el hospedador definitivo.

5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CUATRO MORFOTIPOS LARVARIOS:

5.2.1. ¿Cada morfotipo representa una especie diferente? ¿Existe alguna relación ontogenética entre las larvas? ¿Cuál es su identidad específica?

El análisis molecular mostró 4 secuencias diagnósticas (signatures) LSU entre las secuencias de los metacestodos, independientemente de la especie hospedadora. Estas secuencias se correspondieron con los 4 tipos morfológicos descritos, es decir, una secuencia para *P. delphini*, una para todos los plerocercoides ‘grandes’ independientemente de su localización dentro del hospedador (criptas anales o hígado), una secuencia para *M. grimaldii*, y una para los plerocercoides ‘pequeños’ del colon terminal, que sólo difirió en 1 pb respecto a la de *M. grimaldii*. Al incluir estas secuencias en un árbol filogenético parcial del orden Tetraphyllidea (Figura 1 del capítulo 4.4) los 4 tipos de larvas formaron un clado junto con *Clistobothrium montaukensis* Ruhnke, 1993 y la secuencia de un metacestodo encontrado en el calamar *Loligo gahi* en las Islas Malvinas (Brickle *et al.*, 2001). Aunque el diagnóstico molecular de las diferentes especies de cestodos tetrafilídeos es todavía prematuro, las pequeñas distancias genéticas observadas entre estos taxones parecen indicar que se trata de especies diferentes pero probablemente congénicas, excepto en el caso de *M.*

grimaldii y los plerocercoides ‘pequeños’, que no se puede descartar que sean la misma especie o que pertenezcan a dos poblaciones de la misma especie.

Por tanto, parecen existir 3 especies congénicas de tetrafilídeos parasitando diferentes especies de delfines del Mediterráneo occidental: P. delphini, M. grimaldii y el plerocercóide ‘grande’. Existe la posibilidad de que el plerocercóide ‘pequeño’ sea la forma anterior de desarrollo de M. grimaldii. Y por último, las 3 especies podrían pertenecer al género Clistobothrium.

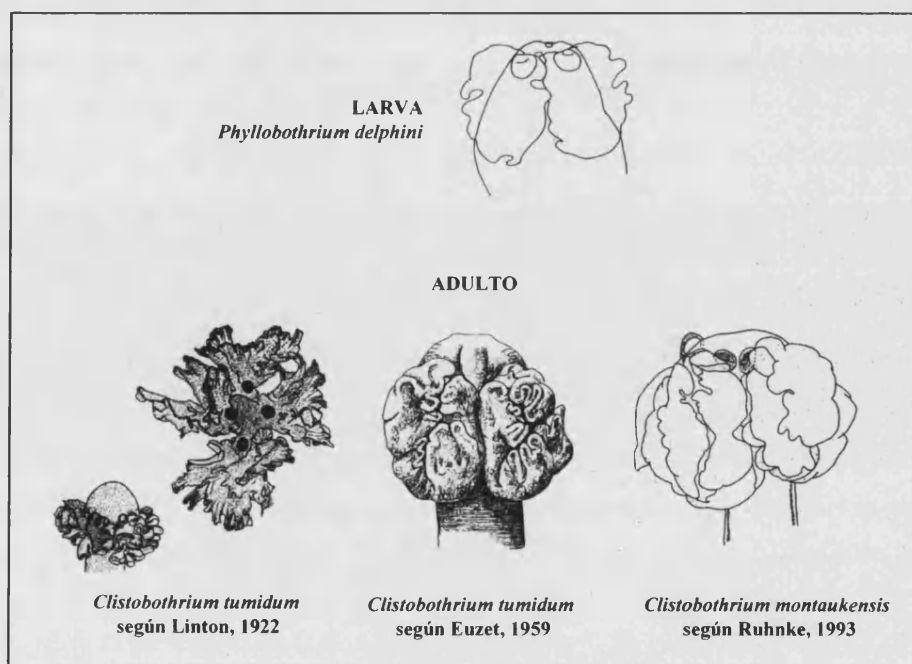
5.2.2. ¿Qué implicaciones tienen estos nuevos resultados moleculares con respecto al conocimiento previo?

Estos resultados clarifican diferentes cuestiones planteadas sobre la identidad y ciclo vital de estas larvas. Por un lado, Dailey (1985) describió **diferentes morfotipos** para *P. delphini*, algunos de ellos hallados en la misma localidad geográfica (Guiart, 1935; Delyamure, 1955; Testa y Dailey, 1977), y sugirió que podrían representar especies distintas. Nuestros ejemplares de *P. delphini* procedentes del delfín listado podrían asignarse al menos a 4 de estos morfotipos. Sin embargo, se ha encontrado una única secuencia genética entre todos los especímenes de *P. delphini* de 3 especies de delfines analizados. Por tanto, es probable que la variedad morfológica encontrada en *P. delphini* por otros autores se deba, al menos en parte, a variabilidad intraespecífica o esté asociada a cambios ontogenéticos (Siquier y Le Bas, 2003).

La segunda aportación importante de estos resultados moleculares se refiere a la **relación entre las formas móviles (plerocercoides) y las formas quísticas (merocercoides)**. Srkjabin (1972) supuso que los plerocercoides ‘pequeño’ (morfotipo I) y ‘grande’ (morfotipo II) podían ser estados anteriores de *P. delphini* y *M. grimaldii*, e incluso propuso a los plerocercoides ‘pequeños’ como el estado anterior de desarrollo de los ‘grandes’. Los resultados moleculares aquí presentados aclaran diversos aspectos de estas hipótesis previas: (I) los plerocercoides ‘pequeños’ y los ‘grandes’ son entidades taxonómicas diferentes; de hecho, los resultados morfométricos no mostraron estados de transición entre ambos tipos; (II) el plerocercóide ‘grande’ no es la forma anterior de *P. delphini* o *M. grimaldii*; (III) no se puede descartar que el plerocercóide ‘pequeño’ pueda ser el estado anterior de *M. grimaldii*, pero el estado plerocercóide de *P. delphini* sigue siendo desconocido. Sin embargo, teniendo en cuenta que: (1) se encontraron grandes cantidades de plerocercoides ‘pequeños’ en la mayoría de delfines analizados en el presente trabajo; (2) el número de plerocercoides ‘pequeños’ secuenciados fue muy bajo (tan sólo 2 especímenes), y (3) la muestra no incluyó individuos de todos los microhábitats (p. ej. el estómago pilórico), existe la posibilidad de que el morfotipo ‘plerocercóide pequeño’ incluya también el estado anterior de *P. delphini*.

Por otra parte, la **relación congénérica de *P. delphini* con *C. montaukensis*** parece apoyada por datos morfológicos y ecológicos. Si asumimos que las estructuras del escólex de los especímenes proglotizados de *P. delphini* no cambian sustancialmente en el hospedador definitivo (véase más arriba), la morfología del escólex se ajusta bien a la descripción dada por Ruhnke (1993) en el diagnóstico genérico de *Clistobothrium* Dailey y Vogelbein, 1990 (Figura 6). La única diferencia entre *P. delphini* y el adulto de las especies del género *Clistobothrium* es que este último no posee un órgano apical. Sin embargo, y como también se ha sugerido anteriormente, el órgano apical de los merocercoides parece degenerar durante el desarrollo larvario y es probable que desaparezca en el estado adulto. Además, diversos autores ya propusieron que *P. delphini* podría ser la fase larvaria de *Clistobothrium tumidum* (Linton, 1922) Ruhnke, 1993 (sinónimo de *Phyllobothrium tumidum*) (Ruhnke, 1993) basándose en el parecido morfológico del escólex (Southwell y Walker, 1936; Johnston y Mawson, 1939; Wardle y McLeod, 1952). Por otro lado, las 3 especies conocidas del género *Clistobothrium* parasitan exclusivamente grandes tiburones pelágicos de la familia Lamnidae, que presentan una distribución cosmopolita, al igual que *P. delphini*, y además, los mamíferos marinos forman parte habitual de la dieta de algunos de estos tiburones (Linton, 1922; Dailey y Vogelbein, 1990; Ruhnke, 1993; Cortés, 1999). Por otro lado, el análisis Bayesiano indicó que *P. delphini* se encuentra muy separado de *Phyllobothrium lactuca* van Beneden, 1849, la especie tipo del género *Phyllobothrium* van Beneden, 1849, por lo que la asignación genérica de *P. delphini* debería revisarse.

Figura 6. Morfología del escólex de *Phyllobothrium delphini* y de algunas especies del género *Clistobothrium*.



La **identidad taxonómica de *M. grimaldii* y del plerocercóide ‘grande’** es más problemática, ya que sus escólices son bastante diferentes del de *P. delphini* y de las especies del género *Clistobothrium*. Además, al no haber encontrado especímenes proglotizados de estas larvas no se sabe si se producirán cambios sustanciales en el escólex cuando se inicie la proglotización. Sin embargo, y como se ha discutido anteriormente, *M. grimaldii* parece encontrarse en un estado de desarrollo similar a *P. delphini* (ambos son merocercóides), y de acuerdo con las pequeñas diferencias observadas entre los individuos proglotizados y no proglotizados de *P. delphini*, no deberían esperarse grandes transformaciones en el escólex de los *M. grimaldii* proglotizados.

Teniendo en cuenta la variabilidad morfológica presente entre *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercóide ‘grande’, es sorprendente la pequeña variación que presenta la región del gen secuenciada en comparación con la de los otros géneros del análisis (Figura 1 del capítulo 4.4). Sin embargo, con tan pocas especies de tetrafilídeos caracterizadas molecularmente, no se puede establecer una regla genética que prediga las fronteras taxonómicas en este orden. Ya que el concepto de especie en los cestodos se basa en los caracteres morfológicos del adulto y teniendo en cuenta que el análisis molecular no encontró ninguna coincidencia entre las larvas del presente estudio y los adultos secuenciados hasta la fecha, pensamos que es mejor no realizar ningún cambio en la asignación genérica de las larvas. La caracterización molecular de los tetrafilídeos de los grandes tiburones pelágicos del Mediterráneo permitirá, con toda probabilidad, encontrar el adulto de estas larvas, y por tanto, establecer su asignación taxonómica correcta.

Las diferentes entidades específicas de *P. delphini* y *M. grimaldii* según los datos moleculares tienen importantes implicaciones con respecto al uso de la morfología y distribución de las **estructuras tegumentales** (sobre todo de los microtricos) en la **sistemática de los cestodos**: las dos especies de merocercóides, *P. delphini* y *M. grimaldii*, presentaron diferencias en la morfología de los microtricos ya en el estado larvario (Figura 6 del capítulo 4.3). Sin embargo, el desconocimiento de la identidad específica de estas larvas y la falta de estudios tegumentales completos en casi todas las especies del género *Clistobothrium* (Ruhnke, 1993; Caira *et al.*, 2001), impiden hacer inferencias sobre posibles cambios ontogenéticos de las estructuras tegumentales en la transformación de larva a adulto. Aún así, nuestros datos sugieren que existen claras diferencias entre *P. delphini* y *M. grimaldii*, y las especies de *Clistobothrium* de las que se conocen parte de las estructuras tegumentales del escólex: la superficie acetabular distal de *C. carcharodon* está cubierta por espinitricos pectinados mezclados con largos filitricos, y la de *C. montaukensis* por largos filitricos. Desafortunadamente, el patrón de los microtricos de la especie mediterránea, *C. tumidum*, todavía no ha sido descrita.

Respecto a los **plerocercoides**, los resultados moleculares indican que los 2 morfotipos representan especies diferentes, y sin embargo, la morfología y patrón de distribución de las **estructuras tegumentales** de ambos tipos, ‘pequeño’ y ‘grande’, son muy similares entre sí. La comparación con otros plerocercoides tetrafilídeos encontrados en peces e invertebrados marinos (Gabrion y Euzet-Sicard, 1979; Caira y Ruhnke, 1991; Khalil, 1995), reveló bastante similitudes en las estructuras tegumentales, aunque algunos de ellos pertenecieran incluso a familias distintas (Phyllobothriidae los de delfines y Onchobothriidae los de algunos crustáceos decápodos; ver Caira y Ruhnke, 1991). Por tanto, parece que existe una homogeneidad morfológica bastante acentuada en las estructuras tegumentales de las larvas tetrafilídeas que se encuentran en el estado plerocercoides, independientemente de la especie a la que pertenezcan.

5.3. PAPEL DE LOS CETÁCEOS EN EL CICLO VITAL DE LAS LARVAS TETRAFILÍDEAS

5.3.1. Estudio ecológico de los 4 tipos larvarios: prevalencia, intensidad de parasitación y selección de hábitat

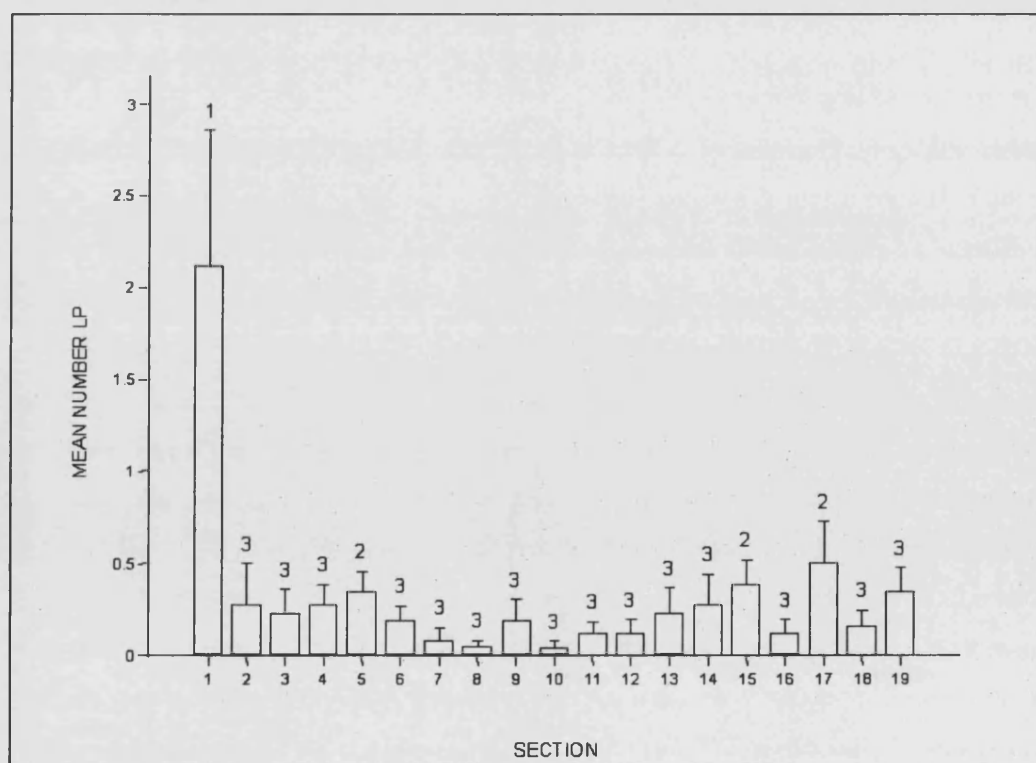
Los 4 tipos de larvas se hallaron con prevalencias de moderadas a altas en 3 especies hospedadoras, delfín listado, delfín mular y calderón gris (Tabla 3, 4 del capítulo 4.4).

Phyllobothrium delphini se encontró preferentemente en la grasa subcutánea alrededor de la hendidura ano-genital, aunque en delfines listados muy parasitados (INI =3) la distribución se extendió hasta la aleta dorsal y el pedúnculo caudal. *M. grimaldii* se encontró en el peritoneo de la cavidad abdominal, especialmente en la región genital, y en los mesenterios del útero, testículos y región colorrectal.

Los **plerocercoides ‘grandes’** se encontraron en el lumen de las 3 cámaras estomacales (aunque raramente), el intestino y los conductos hepatopancreáticos, y dentro de las criptas anales. En los cortes histológicos del canal anal no se encontraron larvas en la submucosa o en el interior de los vasos sanguíneos por debajo del epitelio de la cripta anal. La presencia de plerocercoides dentro de las criptas anales estaba asociada con descamación del epitelio (Figura 2B del capítulo 4.1). La distribución de los plerocercoides dentro del sistema digestivo del hospedador fue similar en las 3 especies de delfines, excepto en que no se encontró ninguna larva en los conductos hepatopancreáticos de los delfines mulares (Tablas 4, 5 del capítulo 4.4). Sin embargo, se deberían analizar más individuos de esta última especie para averiguar si esta ausencia es real o debida simplemente al bajo tamaño muestral. La comparación interespecífica de las frecuencias de

aparición por microhábitat reveló diferencias significativas en los conductos hepatopancreáticos y la sección 20 del intestino (test exacto de Fisher, $p < 0,01$), siendo significativamente mayores en el delfín listado que en las otras 2 especies hospedadoras. En el delfín listado se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de plerocercoides 'grandes' entre microhábitats (test de Cochran, $Q = 133,1$, $n = 31$, $p < 0,001$). El patrón de diferencias a posteriori (tests de McNemar, $p < 0,05$) mostró que la mayor frecuencia de aparición se daba en las criptas anales y en los conductos hepatopancreáticos, seguida de las secciones 1 a 19 del intestino consideradas en conjunto, y por último en las cámaras estomacales (Tabla 4 del capítulo 4.4). La comparación del INI entre las 3 primeras localizaciones (Tabla 5 del capítulo 4.4) indicó que el número de plerocercoides 'grandes' fue mayor en las criptas anales, seguida de los conductos biliares, y por último las secciones intestinales 1-19 (test de Friedman con comparaciones a posteriori, $p < 0,002$). Un test de Kendall indicó que esta ordenación se repetía fiablemente de hospedador a hospedador ($W = 0,89$, 2 g.l., $p < 0,001$). En algunos hospedadores, la intensidad de parasitación fue muy alta, con más de mil larvas dentro de las criptas anales (sección 20 del intestino) (Tabla 5 del capítulo 4.4). La distribución y número medio de plerocercoides 'grandes' por sección en el resto del intestino (secciones 1 a 19) se muestra en la Figura 7. Estos plerocercoides tendían a concentrarse en la parte más anterior del duodeno.

Figura 7. Distribución y número medio de plerocercoides 'grandes' por sección en las secciones 1 a 19 del intestino.



Los plerocercoides ‘pequeños’ se encontraron en el lumen de los estómagos químic y pilórico, y el intestino. No obstante la mayoría de individuos se observaron horadando la mucosa del estómago pilórico y el intestino, hallándose grandes concentraciones (a veces de varios miles de individuos) en el colon terminal y el recto (Tabla 5 del capítulo 4.4). Los cortes histológicos de la pared del estómago pilórico y el colon terminal revelaron que estos plerocercoides se encontraban en el interior de las criptas de la mucosa, siendo éste el máximo grado de penetración de las larvas. Todos los plerocercoides se encontraron con el escólex orientado hacia el polo basal de la lamina propia (Figura 2A del capítulo 4.1). No se encontró ningún plerocercóide ‘pequeño’ en los conductos hepatopancreáticos de ninguno de los 62 delfines examinados. La distribución dentro de los hospedadores fue similar en las 3 especies hospedadoras (Tablas 4, 5 del capítulo 4.4), y no se observaron diferencias significativas en las frecuencias de aparición por microhábitat entre especies hospedadoras (todos los tests de Fisher, $p > 0,05$). En el delfín listado, la frecuencia de aparición de estas larvas fue mayor en el estómago pilórico que en el resto de cámaras estomacales (test de Cochran con tests de MacNemar a posteriori $p < 0,05$), mientras que la sección 20 del intestino tuvo una frecuencia similar al estómago pilórico y mayor que el resto de secciones intestinales consideradas en conjunto (secciones 1-19) (tests de MacNemar por parejas $p < 0,05$) (Tabla 4 del capítulo 4.4). La comparación del INI entre estas 3 últimas localizaciones (Tabla 5 del capítulo 4.4) indicó diferencias significativas sólo entre la sección 20 y el resto del intestino (secciones 1-19) (test de Friedman con comparaciones a posteriori, $p < 0,001$). El test de Kendall indicó que los niveles de infección por microhábitat se repetía de manera similar de hospedador a hospedador ($W = 0,53$, 2 g.l., $p < 0,001$). El estudio detallado de la mucosa de la última sección del intestino (sección 20) en 32 delfines listados, 5 calderones grises y 3 delfines mulares, indicó que los plerocercoides ‘pequeños’ horadaban preferentemente la segunda mitad de esta sección, excepto el canal anal. En 29 delfines listados, 2 calderones grises y 3 delfines mulares, la máxima concentración se dio en la porción del colon terminal adyacente al recto; en un delfín listado y un calderón gris, la máxima concentración apareció en el recto, mientras que en 2 delfines listados y 2 calderones grises, se detectaron cantidades similares en ambos sitios.

El presente estudio ecológico muestra un patrón claro de selección de hábitat: cada tipo larvario apareció predeciblemente en microhábitats específicos dentro del delfín independientemente de la especie hospedadora.

A. Las localizaciones descritas en este estudio para *P. delphini* y *M. grimaldii*, es decir, la grasa subcutánea y el peritoneo y mesenterios abdominales, principalmente de la región ano-genital, fueron las mismas que las registradas en la bibliografía para la mayoría de cetáceos y pinnípedos (George-Nascimento y Carvajal, 1981; McColl y Obendorf, 1982; Bester, 1989; Norman, 1997; Gibson *et al.* 1998; Walker, 2001 y referencias del trabajo).

B. Los plerocercoides ‘grandes’ aparecieron principalmente en las **criptas anales** en todas las especies de delfines analizadas. La baja prevalencia e intensidad por sección en el lumen del resto del intestino podría sugerir que las larvas estaban migrando pasivamente por él para alcanzar el canal anal. Estos plerocercoides se encontraron también en cantidades moderadas en el lumen de los **conductos hepáticos y pancreáticos** de los delfines listados y calderones grises. Existen 2 caminos alternativos por los cuales las larvas podrían alcanzar este microhábitat. Algunos plerocercoides ‘grandes’ de las criptas anales podrían entrar en los vasos sanguíneos de la submucosa, migrar por el sistema porta-hepático, y llegar hasta las venas intrahepáticas, pasando a continuación al interior de los conductos hepatopancreáticos. Sin embargo, esta hipótesis es improbable debido a que no encontramos larvas cruzando la submucosa del canal anal ni en el interior de las venas intrahepáticas. Además, estas larvas son quizá demasiado grandes para migrar a través del sistema circulatorio. Alternativamente, los plerocercoides ‘grandes’ podrían ascender por el conducto hepatopancreático desde su extremo distal, el cual se abre en la ampolla duodenal (primera sección intestinal) en las 3 especies de delfines analizadas. Curiosamente, encontramos significativamente más plerocercoides ‘grandes’ en la primera sección intestinal que en las otras. Quizás estas larvas provengan de los conductos hepatopancreáticos o estén en proceso de ascensión. De cualquier modo, la razón por la cual la misma especie de larva tiende a acumularse en 2 microhábitats tan distintos es desconocida.

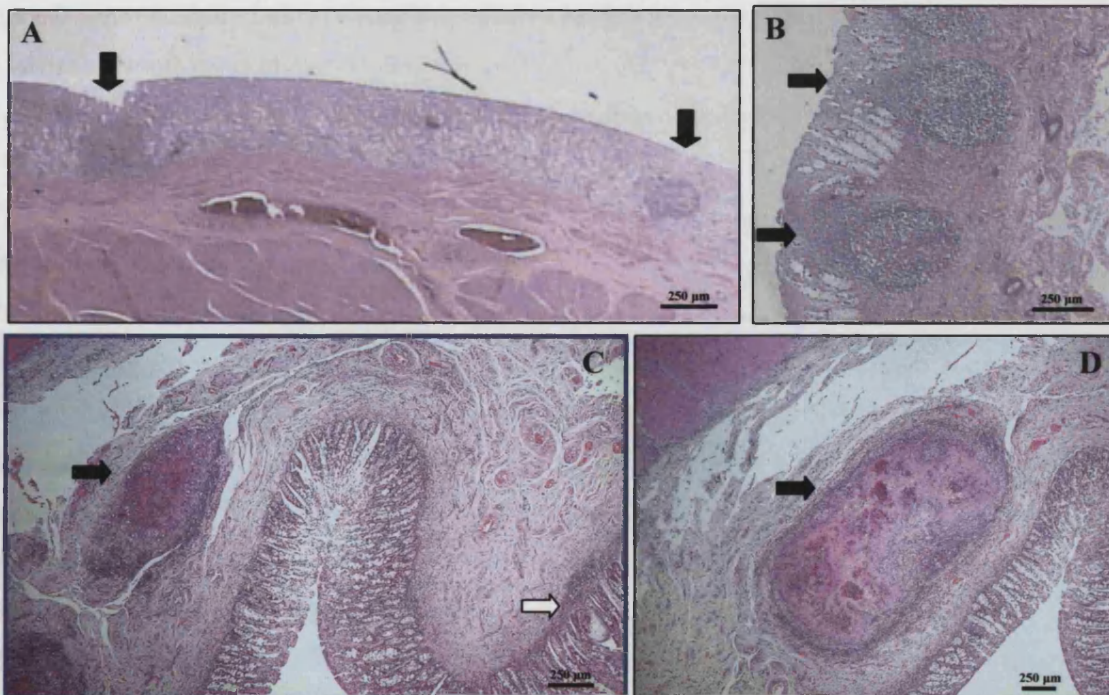
C. Los plerocercoides ‘pequeños’ tendieron a concentrarse en 2 regiones del digestivo, la mucosa del **colon terminal y recto**, y el **estómago pilórico**. Los plerocercoides ‘pequeños’ se encontraron también en el lumen de las secciones 1-19 del intestino, pero con una prevalencia e intensidad por sección significativamente menores que en la última sección, por lo que es probable que simplemente se trate de larvas migrantes hacia el colon terminal y recto.

Si realmente los plerocercoides ‘pequeños’ son la fase anterior de *M. grimaldii*, ¿qué nos dice la selección de hábitat de estos plerocercoides respecto a las posibles rutas de migración para alcanzar los mesenterios y peritoneo de la cavidad abdominal donde se transformarían en *M. grimaldii*?

Skrjabin (1972) sugirió que *P. delphini* y *M. grimaldii* infectarían a los cetáceos como plerocercoides, usando el sistema circulatorio y/o linfático para alcanzar los microhábitats donde se transformarían en merocercoides. El presente estudio muestra que los plerocercoides ‘pequeños’ tendían a concentrarse en una región específica del colon terminal, donde la mucosa y submucosa es rica en nódulos linfáticos (Figura 8B del presente trabajo; Simpson y Gardner, 1972).

Curiosamente, esta región del intestino está directamente conectada con el peritoneo de la cavidad abdominal a través de un corto mesenterio que lleva unos nodos linfáticos llamados mesocólicos (Cowan y Smith, 1999). Este mesenterio sería el camino más corto para que los plerocercoides ‘pequeños’ del colon terminal pudieran alcanzar rápidamente los microhábitats donde aparece *M. grimaldii* (peritoneo y mesenterios de la cavidad abdominal) a través del sistema linfático. Los plerocercoides ‘pequeños’ aparecieron también en concentraciones significativas en la pared del estómago pilórico, la submucosa del cual contiene también nódulos linfáticos bien desarrollados (Figura 8A del presente trabajo; Simpson y Gardner, 1972). Este microhábitat podrían servir como sitio alternativo para el estado plerocercoides de *M. grimaldii*, y/o quizás *P. delphini*, para entrar en el sistema linfático. Sin embargo, los cortes histológicos de la pared del colon terminal y el estómago pilórico no mostraron larvas más allá de la lámina propia. Por tanto, si la hipótesis anterior es cierta, el paso al sistema linfático debe realizarse a nivel de la mucosa, o bien, mediante una migración a través de la submucosa para alcanzar los vasos linfáticos subyacentes. En los cortes realizados no se detectaron larvas atravesando la submucosa, por lo que si esta migración realmente ocurre debe ser rápida. De hecho, en algunas secciones del colon terminal se observaron una serie de granulomas en la submucosa que podrían representar larvas migrantes que fueron atrapadas y eliminadas por el sistema inmune del hospedador (Figura 8C, D).

Figura 8. Cortes histológicos de la pared del estómago pilórico (A) y del colon terminal de un delfín listado (B, C, D). A y B, las flechas señalan nódulos linfáticos de la mucosa. C y D, las flechas negras señalan granulomas de la submucosa; la flecha blanca indica la localización de un plerocercoides ‘pequeño’ en la mucosa.



5.3.2. Patrones en las relaciones parásito-hospedador

Para investigar estas relaciones se recopilaron todos los datos disponibles en la bibliografía sobre presencia de los 4 tipos larvarios en mamíferos marinos de todo el mundo. Los datos de los plerocercoides se muestran en la Tabla 1 del capítulo 4.1, mientras que los de *P. delphini* y *M. grimaldii* se encuentran en la Tabla 6 del capítulo 4.4. Del análisis de dichas tablas se extrajeron 3 conclusiones interesantes:

1. Ninguno de los 4 tipos larvarios ha sido citado comúnmente en la mayoría de especies de misticetos; la única excepción es el estudio de Rice (1977) sobre *Balaenoptera borealis*, en el cual *P. delphini* fue encontrado en 22.2% de 284 hospedadores.
2. En odontocetos existe una clara segregación entre las especies costeras, las cuales no están parasitadas por estas larvas o lo están muy poco, y las especies pelágicas, en las cuales la presencia de estas larvas es común. Existen 2 especies costeras que representan la excepción a este patrón: *Cephalorhynchus hectori* en Nueva Zelanda (*P. delphini* en 40.5% de 37 hospedadores; Slooten y Dawson, 1994) y *C. heavisidii* en Namibia (*P. delphini* en 50% de 20 hospedadores; Best y Abernethy, 1994).
3. Las citas de larvas tetrafilídeas en pinnípedos son escasas, excepto en 5 casos: *Callorhinus ursinus* en las Islas Comodoro, océano Pacífico noroccidental (plerocercoides ‘pequeño’ en el intestino grueso en 13% de 322 lobos marinos; Skrjabin y Yurakhno, 1987); *Arctocephalus australis* en Brasil (*P. delphini* en 55.5% de 9 hospedadores; Soares, 1986); *A. tropicalis* en Isla Gough, Atlántico Sur (*P. delphini* en 95.5% de 192 hospedadores; Bester, 1989); *Otaria byronia* en Chile (*P. delphini* en 14.3% de 7 hospedadores; George-Nascimento y Carvajal, 1981) y *Mirounga leonina* en la Antártida (infecciones masivas de *P. delphini* en un número indeterminado de hospedadores; véase Lauckner, 1985).

Estos datos revelan dos patrones claros de infección en los mamíferos marinos:

- A. Las larvas de tetrafilídeos aparecen normalmente en mamíferos marinos que se **alimentan de peces y/o cefalópodos**. Esto explicaría por qué su aparición en ballenas que se alimentan de krill es esporádica. De hecho, estas larvas sólo son comunes en misticetos que se alimentan de peces de forma sustancial (Skrjabin, 1972; Rice, 1977).
- B. Estas larvas tienden a parasitar mamíferos marinos de **hábitos pelágicos**. Este patrón está especialmente bien ilustrado en el caso de especies congénicas de cetáceos, o incluso en poblaciones de la misma especie, que habitan aguas costeras o pelágicas. Por ejemplo, en aguas de Inglaterra y Gales, *Lagenorhynchus acutus* y *L. albirostris* suelen exhibir distribuciones pelágicas y costeras respectivamente (Reid *et al.*, 2003). Gibson *et al.* (1998) encontró *P. delphini* y *M. grimaldii* sólo en la primera especie. En las poblaciones pelágicas de *Phocoenoides dalli*, la prevalencia de *P. delphini* fue significativamente mayor que en

las poblaciones más costeras (Machida, 1974; Walker, 2001), y además, nunca ha sido citado en especies costeras de marsopas (Raga, 1994; Corcuera *et al.*, 1995; Gibson *et al.* 1998). Finalmente, los niveles de infección de *P. delphini* se han utilizado incluso para distinguir poblaciones costeras y pelágicas de delfín mular (Walker, 1981; Van Waerebeek *et al.*, 1990; Hoelzel *et al.*, 1998). La escasez de citas de larvas tetrafilídeas en pinnípedos podría estar relacionada con los hábitos costeros de éstos, más que con la incapacidad de las larvas de sobrevivir en estos hospedadores. Por ejemplo, *Arctocephalus tropicalis*, aparece frecuentemente infectado con *P. delphini* cuando estos hospedadores se alimentan en áreas oceánicas (Bester, 1989).

Resumiendo, la frecuencia de aparición de las larvas tetrafilídeas en mamíferos marinos parece estar gobernada principalmente por factores ecológicos como el hábitat y la dieta del hospedador.

¿Se cumple este patrón en las especies de delfines analizadas en el presente trabajo?

En el Mediterráneo occidental, los delfines mulares, delfines listados y calderones grises tienden a habitar aguas alejadas de la costa, especialmente las 2 últimas especies (Gómez de Segura *et al.*, 2004). Las 3 especies de cetáceos aparecieron infectadas de forma moderada o alta con los 4 tipos de larvas tetrafilídeas, ajustándose al patrón general observado en otras localidades geográficas.

Sin embargo, un análisis más detallado de las prevalencias y el INI de estas larvas en las 3 especies de cetáceos mostró algunas diferencias significativas. Respecto a *P. delphini* y el pleroceroide ‘grande’, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición entre especies hospedadoras (test exacto de Fisher, $p < 0,001$); la comparación por parejas mostró que las diferencias fueron significativas entre el delfín listado y el calderón gris. Sin embargo, para *M. grimaldii* y el pleroceroide ‘pequeño’ no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aparición entre especies de delfines (test exacto de Fisher, $p > 0,05$ para *M. grimaldii* y $p > 0,10$ para el pleroceroide ‘pequeño’). Para *P. delphini* y *M. grimaldii*, el INI fue significativamente mayor en el delfín listado que en las otras 2 especies de cetáceos (test de Kruskal-Wallis con comparaciones a posteriori, $p < 0,05$). El INI general de los plerocercoides no pudo ser analizado debido a que los datos se dan en forma de índice y por separado para cada microhábitat. Un análisis preliminar de los INIs por microhábitat mostró diferencias significativas sólo para los plerocercoides ‘grandes’ del canal anal entre el delfín listado y el calderón gris (test de Kruskal-Wallis con comparaciones a posteriori, $p < 0,05$). Sin embargo, el tamaño muestral para el delfín

mular y el calderón gris fue muy pequeño, por lo que estos resultados deben considerarse con precaución.

En resumen, parece existir una tendencia a que las infecciones de *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercioide ‘grande’ sean **mayores en el delfín listado**. Sin embargo, esta hipótesis debería testarse utilizando datos más precisos sobre intensidad de parasitación para todas las especies hospedadoras, y un mayor tamaño muestral en el caso del delfín mular y el calderón gris. Si estas diferencias son reales, con toda probabilidad éstas son reflejo de los diferentes hábitos alimenticios de las 3 especies de cetáceos (Blanco *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2006; Blanco, comunicación personal).

5.3.3. Papel de los cetáceos en el ciclo vital de los tetrafilídeos

No se conoce el estado adulto de ninguna de las larvas tetrafilídeas halladas en mamíferos marinos. Esto ha generado una gran especulación sobre el papel de estos mamíferos en su ciclo vital (Delyamure, 1955; Williams, 1968; Skrjabin, 1972; McColl y Obendorf, 1982; Bester, 1989; Garippa *et al.*, 1991; Norman, 1997). La mayoría de autores coincide en señalar que los mamíferos marinos podrían ser hospedadores intermediarios para *P. delphini* y *M. grimaldii*, y los grandes tiburones pelágicos sus hospedadores definitivos más probables (Southwell y Walker, 1936; Johnston y Mawson, 1939; Dollfus, 1964; Testa y Dailey, 1977; Walker, 2001). Dos líneas de evidencia han apoyado tradicionalmente esta hipótesis. En primer lugar, estos merocercoides poseen una estructura especializada, una vesícula llena de líquido en el interior de la cual se encuentra el escólex invaginado, que sólo aparecen en los mamíferos marinos y que es excepcional entre los tetrafilídeos (Chervy, 2002). Por tanto, se debe producir un cambio ontogenético dentro de estos hospedadores. Además, se piensa que esta peculiar modificación morfológica debe tener algún valor adaptativo. Por ejemplo, Norman (1997) sugirió que la estructura quística de *M. grimaldii* podía proteger la larva mientras era ingerida por un tiburón depredador, o bien la mantenía viable desde la muerte natural del hospedador hasta su ingestión por un tiburón carroñero. En segundo lugar, los microhábitats seleccionados por *P. delphini* y *M. grimaldii* en los mamíferos marinos podrían aumentar la probabilidad de transmisión al hospedador definitivo (Geraci y Aubin, 1987; Garippa, *et al.* 1991; Walker, 2001). Los mamíferos marinos representan una importante fuente de recursos alimenticios para los grandes tiburones (Long y Jones, 1996; Cortés, 1999; Heithaus, 2001), que a menudo consumen sólo partes específicas de estos mamíferos (Martin *et al.*, 2005), particularmente la región abdominal y caudal (Long y Jones, 1996; Walker, 2001).

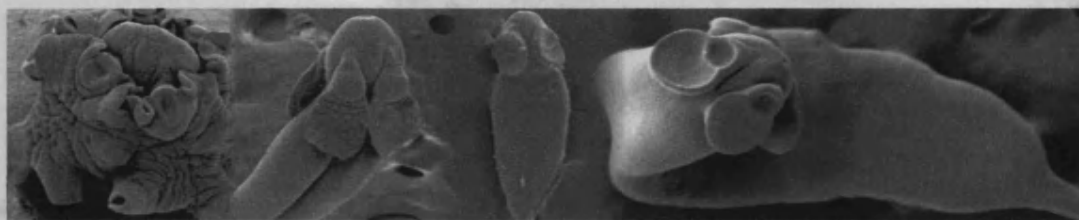
Las evidencias que se desprenden del presente estudio apoyan de manera contundente esta hipótesis. Existe una estrecha relación, tal y como indican los resultados moleculares, entre los 4 tipos de larvas que aparecen en delfines y el estado adulto de *C. montaukensis*. Todas las especies

del género *Clistobothrium* están restringidas a grandes tiburones pelágicos (familia Lamnidae) (Ruhnke, 1993), entre ellos el tiburón blanco, *Carcharodon carcharias*. En el mar Mediterráneo, por ejemplo, los ejemplares juveniles grandes y los adultos de este tiburón se alimentan principalmente de odontocetos y grandes peces pelágicos (Fergusson, 1996; Fergusson *et al.*, 2000). Además, *P. delphini* y *M. grimaldii* parasitan comúnmente a mamíferos marinos que suelen habitar en el medio pelágico. Por otro lado, los análisis moleculares y de selección de hábitat sugieren que *M. grimaldii* entraría en el cuerpo del delfín como plerocercario y seguiría una ruta de migración predecible hasta alcanzar los microhábitats donde adoptaría su morfología quística.

El conjunto de datos morfológicos, moleculares y ecológicos sugiere que los mamíferos marinos realmente juegan un papel importante en el ciclo vital de algunas especies de cestodos tetrafilídeos, especialmente para *P. delphini* y *M. grimaldii*, pero, evolutivamente, ¿qué factores facilitaron la inclusión de los estos hospedadores en el ciclo vital de las larvas? Estudios filogenéticos indican que el origen de la asociación entre tetrafilídeos y sus hospedadores definitivos, los condriactos, es muy antigua (> 100 ma.) (Hoberg *et al.*, 1999). Por tanto, cuando el ancestro de los cetáceos y pinnípedos colonizó el medio oceánico (Eoceno, 55-34 ma., y Oligoceno Tardío, 27-25 ma., respectivamente; Fordyce, 2002; Berta, 2002) el ciclo vital de estos cestodos ya debía estar bien establecido. Es muy probable que dicho ciclo fuera muy similar al actual, utilizando a un pequeño invertebrado como primer hospedador intermediario, y a teleósteos, cefalópodos y otros invertebrados marinos como segundos hospedadores intermediarios y/o paraténicos. La llegada de los mamíferos marinos al nuevo medio alteró la estructura de las redes tróficas, ya que éstos podían actuar a la vez como nuevos predadores en un nivel alto de la red trófica (de peces y cefalópodos sobre todo) y como presas potenciales (de tiburones). De esta forma, muchas larvas tetrafilídeas podían acabar ahora en los mamíferos marinos, los cuales, a su vez, podían ser consumidos por algunas especies de tiburones. Por tanto, la inclusión de estos mamíferos en el ciclo vital de los tetrafilídeos podía ser ventajosa si el coste de sobrevivir en estos nuevos hospedadores fuera bajo, y la predación de los tiburones sobre los mamíferos marinos fuera suficientemente alta. El proceso por el cual un nuevo hospedador intermediario es añadido en un nivel trófico inferior de un ciclo vital se denomina ‘incorporación inferior’ (Parker *et al.*, 2003a). De acuerdo con estos autores, un nuevo hospedador intermediario podría evolucionar entre 2 hospedadores sucesivos si esto incrementa suficientemente la probabilidad de transmisión del parásito entre ellos. Por un lado, los mamíferos marinos pueden acumular muchas más larvas que los peces y cefalópodos ya que son organismos más grandes, viven durante más tiempo y son animales endotermos en un medio acuático, lo que les obliga a mantener un nivel elevado de consumo de presas (Williams *et al.*, 2001). Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, los mamíferos marinos forman parte habitual de la dieta de algunas especies de grandes tiburones. De este modo, con la inclusión de estos hospedadores en su ciclo vital, las larvas evitarían la mortalidad asociada a la predación por

parte de los mamíferos marinos e incrementarían la transmisión al hospedador definitivo (Parker *et al.*, 2003a). Además, un hospedador intermediario que acumule muchas larvas podría aumentar la probabilidad de que éstas encuentren pareja reproductora en el hospedador definitivo (Brown *et al.*, 2001), promoviendo también la mezcla de genotipos en el hospedador intermediario (Rauch *et al.*, 2005). (Nótese, sin embargo, que esto podría incrementar también la competencia intraespecífica entre las larvas). Por último, gracias a la gran talla de los mamíferos marinos, las larvas podrían alcanzar un tamaño y desarrollo mayor sin llegar a ser letales para el hospedador (Parker *et al.*, 2003b). Uno de los mayores beneficios de esta estrategia es que la larva podría empezar a reproducirse inmediatamente en cuanto llegase al hospedador definitivo. De hecho, en el estado merocercóide de *P. delphini*, el escólex parece estar totalmente desarrollado, e incluso, en algunos individuos la proglotización ya ha comenzado (véase más arriba).

El papel de los delfines mediterráneos en el ciclo vital del plerocercóide ‘grande’ es más difícil de establecer. Los resultados moleculares indican que estos plerocercoides están muy relacionados con *P. delphini* y *M. grimaldi*, pero no se transforman en formas quísticas (merocercoides) en el delfín. Como el estado plerocercóide de los tetrafilideos se encuentra normalmente en peces, cefalópodos y otros invertebrados (Euzet, 1959; Threlfall, 1970; Wojciechowska, 1993), cabe la posibilidad de que los plerocercoides ‘grandes’ se adquieran accidentalmente con las presas. Sin embargo, estos plerocercoides aparecen en los delfines con una prevalencia y abundancia altas, y realizan migraciones predecibles a microhábitats específicos dentro del hospedador, las criptas anales y los conductos hepatopancreáticos. Este comportamiento no debería esperarse en una larva que es ingerida accidentalmente. Antes bien, los plerocercoides ‘grandes’ podrían estar seleccionando hábitats seguros, particularmente las criptas anales, con el fin de evitar ser eliminados con las heces debido al fuerte flujo intestinal. Todas estas características del patrón de infección de los plerocercoides sugieren que los delfines podrían estar actuando, al menos, como hospedadores paraténicos para estos parásitos. El hecho de que el plerocercóide ‘grande’ esté relacionado molecularmente con *C. montaukensis*, y que aparezca sólo en cetáceos pelágicos, apoyaría esta hipótesis. Además, la tendencia a concentrarse en las criptas anales podría ser ventajoso en la transmisión al hospedador definitivo, ya que, como se ha mencionado anteriormente, los tiburones suelen atacar a los delfines principalmente por la parte ventro-posterior. En cualquier caso, todavía existen demasiadas lagunas en el conocimiento de estas larvas como para establecer cualquier conclusión firme.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 6.1. Se detectaron 3 tipos de larvas de cestodos tetrafilídeos en 4 especies de cetáceos del Mediterráneo occidental analizados en el presente trabajo: los merocercoides *Phyllobothrium delphini* y *Monorygma grimaldii* en el delfín listado, delfín mular y calderón gris, y diversos plerocercoides en el sistema digestivo de las 3 especies de delfines mencionadas y en el zifio de Cuvier.
- 6.2. Independientemente de la especie hospedadora y de la localidad geográfica existen 2 tipos de plerocercoides tetrafilídeos en los mamíferos marinos analizados hasta la fecha. Ambos poseen una morfología similar (cuerpo con forma lanceolada y escólex con una ventosa apical y 4 botridios monoloculares con ventosa accesorio), pero se distinguen fácilmente por el tamaño. Las variables morfométricas que mejor separan ambos tipos son la longitud total de la larva y la anchura del botridio, y usamos los nombres ‘pequeño’ y ‘grande’ para diferenciarlos.
- 6.3. La morfología general de los individuos de *P. delphini* y *M. grimaldii* que parasitan cetáceos del Mediterráneo occidental concuerda con las descripciones previas de estos merocercoides en otros hospedadores y otras localidades geográficas, excepto en la estructura del órgano apical. La variabilidad observada en este órgano, tanto entre ejemplares de cetáceos mediterráneos como en las descripciones de la literatura, podría ser el reflejo de diferentes estados en el proceso de degeneración y posterior desaparición del órgano apical. Por otra parte, se hallaron por primera vez ejemplares de *P. delphini* mostrando un inicio de proglotización y primordios genitales en los proglótides más desarrollados. El escólex de estos merocercoides fue muy similar al de los individuos sin proglótides del mismo individuo hospedador.
- 6.4. El tegumento de todos los individuos analizados de *P. delphini*, *M. grimaldii* y los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’ se encuentra totalmente recubierto por microtricos. Se observaron 4 morfotipos básicos: filitricos, espinitricos lanceolados, y 2 tipos nuevos, espinitricos cónicos con 2 proyecciones paralelas y pequeñas en la punta, y espinitricos cilíndricos coronados por 6-7 pequeñas papilas. Los 2 tipos de plerocercoides presentaron filitricos y espinitricos lanceolados, y su distribución fue similar en ambos plerocercoides. Los merocercoides exhibieron una mayor variedad de microtricos, presentando filitricos, espinitricos lanceolados, espinitricos cónicos en el botridio distal de *M. grimaldii* y espinitricos cilíndricos coronados en el de *P. delphini*.

- 6.5. Además de los microtricos, se observaron otras estructuras tegumentales en la ventosa apical de los plerocercoides y en toda la superficie adherente o distal del botridio, incluida la ventosa accesoria, de los 4 tipos larvarios. Estas estructuras tenían forma de cilio y estaban rodeadas por multitud de filitricos en el caso de los merocercoides. A partir de su morfología externa y a su distribución en el escólex se les atribuye una función sensorial.
- 6.6. El análisis molecular de *P. delphini*, *M. grimaldii* y los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’ mostró 4 únicas secuencias diagnósticas (signatures) LSU que correspondieron con los 4 tipos morfológicos. Estas secuencias fueron idénticas dentro de cada morfotipo independientemente de la especie hospedadora y el microhábitat dentro del hospedador. La inclusión de estas secuencias en un árbol filogenético parcial del orden Tetraphyllidea mostró que los 4 tipos de larvas forman un clado junto con *Clistobothrium montaukensis*. Las pequeñas distancias genéticas observadas entre estos taxones parecen indicar que se trata de especies diferentes pero congénicas, aunque en el caso del plerocercóide ‘pequeño’ y *M. grimaldii* estas distancias son aún menores, sugiriendo diferencias intraespecíficas.
- 6.7. El análisis filogenético indica que *P. delphini* se encuentra muy separado de *Phyllobothrium lactuca*, la especie tipo del género *Phyllobothrium*. *P. delphini* y *M. grimaldii* aparecen cercanamente relacionado con *C. montaukensis*, pudiendo ser congénicos. La morfología del escólex de *P. delphini* es muy similar al escólex de la mayoría de especies del género *Clistobothrium*, y bastante diferente del de *P. lactuca*. Sin embargo, el escólex de *M. grimaldii* difiere considerablemente del de las especies de *Clistobothrium*.
- 6.8. La morfología y distribución de las estructuras tegumentales (sobre todo de los microtricos) está empezando a ser utilizada como herramienta en la sistemática de los cestodos adultos. Nuestro estudio muestra que la divergencia morfológica y molecular entre *P. delphini* y *M. grimaldii* está asociada con diferencias en la morfología de los microtricos ya en el estado larvario. En el estado plerocercóide, los datos moleculares y morfológicos propios y de la literatura parecen indicar que, en general, las estructuras tegumentales de los plerocercoides tetrafilídeos presentan una morfología bastante homogénea independientemente de la especie. Por tanto, en ese estado de desarrollo, los microtricos carecen de valor diagnóstico.
- 6.9. Se encontró *P. delphini*, *M. grimaldii* y los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’ con prevalencias e intensidades de parasitación de moderadas a altas en el delfín listado, delfín mular y calderón gris. Cada tipo larvario apareció predeciblemente en microhábitats específicos dentro de cada cetáceo independientemente de la especie hospedadora: *P. delphini* y *M. grimaldii* enquistados en la grasa subcutánea y en el peritoneo y mesenterios de la cavidad

abdominal respectivamente, sobre todo en la región ano-genital; los plerocercoides ‘grandes’ en el lumen de estómagos e intestino, dentro de las criptas anales y en los conductos hepáticos y pancreáticos (excepto en esta última localización en los delfines mulares), tendiendo a acumularse en criptas anales, hígado y páncreas; los plerocercoides ‘pequeños’ en el lumen de los estómagos químico, pilórico y en el intestino, aunque la mayoría se observaron horadando la mucosa del estómago pilórico y del colon terminal y recto. Esta es la primera vez que se describen los microhábitats de los plerocercoides en cetáceos de forma detallada.

- 6.10. Los resultados moleculares y de selección de hábitat sugieren que los plerocercoides ‘pequeños’ podrían ser el estado anterior de desarrollo de, al menos, *M. grimaldii*, pudiendo migrar a través del sistema linfático desde los microhábitats donde estos plerocercoides tienden a acumularse hasta los sitios donde se transformarían en la forma quística.
- 6.11. Se observaron 2 patrones claros de infección de los 4 tipos larvarios en los mamíferos marinos: las larvas de cestodos tetrafilídeos infectan normalmente mamíferos marinos que tienen hábitos pelágicos y que se alimentan de peces y/o cefalópodos.
- 6.12. Diversas líneas de evidencia sugieren que los mamíferos marinos actúan como hospedadores intermediarios para *P. delphini* y *M. grimaldii*, y al menos como hospedadores paraténicos para el plerocercoides ‘grande’: (1) los merocercoides presentan una estructura quística especializada, por lo que debe producirse un cambio ontogenético dentro del hospedador; (2) el análisis molecular muestra que todos los tipos larvarios están estrechamente relacionados con *C. montaukensis*, parásito de grandes tiburones pelágicos de la familia Lamnidae, que suelen alimentarse de mamíferos marinos; (3) estas larvas infectan habitualmente cetáceos y pinnípedos pelágicos; (4) tanto los merocercoides como los plerocercoides fueron encontrados en 3 especies de cetáceos mediterráneos con prevalencias e intensidades de parasitación de moderadas a altas, apareciendo en microhábitats predecibles dentro del cuerpo del hospedador.
- 6.13. La inclusión de los mamíferos marinos en el ciclo vital de los tetrafilídeos debió producirse por procesos de ‘incorporación inferior’ justo antes del hospedador definitivo, ya que poseen algunas presas comunes con los tiburones y a la vez son presas habituales de éstos. Este proceso se vería facilitado porque la probabilidad de transmisión de las larvas al hospedador definitivo se incrementa sustancialmente con la inclusión de los mamíferos marinos en su ciclo vital, ya que éstos actúan como grandes acumuladores de los 3 tipos larvarios. Además, se favorece la mezcla de genotipos larvarios en los nuevos hospedadores así como la probabilidad de encontrar pareja reproductora. Por último, la larva puede alcanzar un grado de desarrollo

mayor en el mamífero marino pudiendo empezar a reproducirse rápidamente al llegar al hospedador definitivo.



APÉNDICES 1 Y 2

7. APÉNDICE 1. ¿UNA PIEZA MÁS EN EL ROMPECABEZAS DEL CICLO VITAL DE LOS TETRAFILÍDEOS?

DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA LARVA

En el lumen de la última sección intestinal de uno de los delfines listados analizados se encontró una larva de cestodo con una morfología diferente a la de los plerocercoides ‘pequeño’ y ‘grande’. Se trata de un plerocercoides en el que se aprecian 3 regiones (*sensu* Stunkard, 1977): el escólex o *pars botridialis*, un cuello o *pars proliferus*, y una parte posterior o *pars postica* con forma lanceolada (Figura 9A). El escólex posee un órgano apical y cuatro botridios monoloculares con una ventosa accesoria anterior cada uno (Figura 9B). Los botridios son sésiles, la mitad posterior del lóbulo del botridio es libre, sus bordes son ligeramente ondulados y se unen antero-lateralmente a la ventosa accesoria. La región apical del escólex es redondeada y sobresale ligeramente por encima de los botridios. El órgano apical no tiene la forma típica de una ventosa, pero su estructura detallada no pudo ser observada. Es probable que este órgano se encontrara en alguna fase del proceso de degeneración de la ventosa apical original, como parece que ocurre en el órgano apical de *P. delphini* y *M. grimaldii* (capítulo 4.2). Las medidas de este espécimen se muestran en la Tabla 3.

Figura 9. Plerocercoides tetrafilídeo descrito en el presente apéndice y hallado en el intestino de un delfín listado del Mediterráneo occidental. A. Especimen completo mostrando sus regiones corporales según Stunkard (1977); escala: 0,5 mm. B. Detalle del escólex; escala: 0,1 mm.

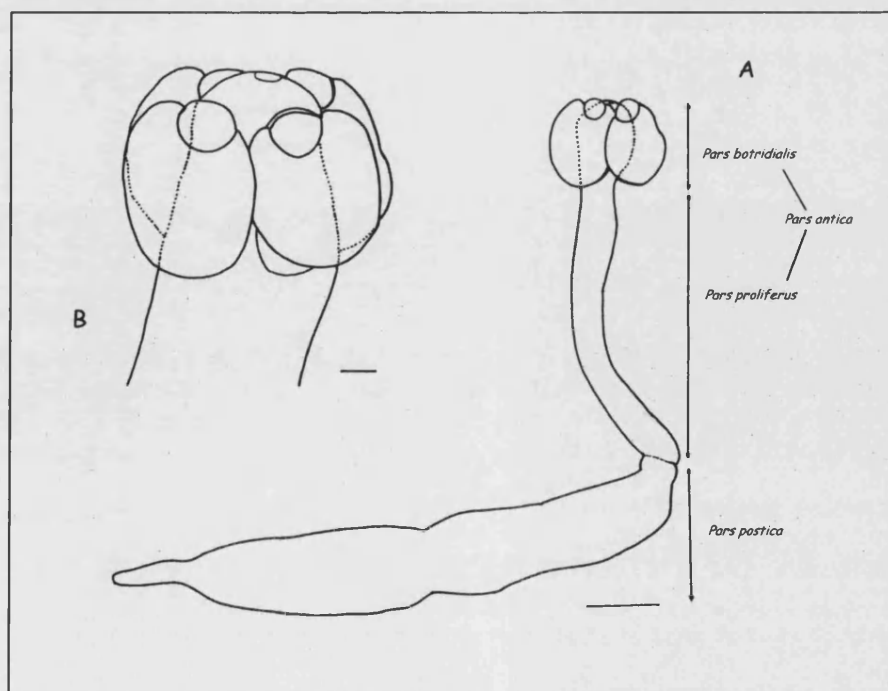


Tabla 3. Medidas del pleroceroide tetrafilídeo descrito en este apéndice. Medidas en micrómetros excepto cuando se especifique otra unidad.

Variable [†]	Medidas	Notas
Longitud total pleroceroide	7,6	unidades: mm
Longitud <i>pars proliferus</i>	2,0	unidades: mm
Anchura <i>pars proliferus</i>	223	
Longitud <i>pars antica</i>	2,6	unidades: mm
Longitud <i>pars postica</i>	4,0	unidades: mm
Anchura <i>pars postica</i>	581	
Longitud escólex	618	SL
Anchura máxima escólex	745	MSW
Anchura pedúnculo escólex	427	SPW
Longitud región apical escólex	91	AMSPL
Anchura región apical escólex	355	AMSPW
Diámetro externo órgano apical	46	EDAPO
Diámetro interno órgano apical	88	IDAPO
Longitud botridio	495	BL
Anchura botridio	377	BW
Longitud ventosa accesoria	141	ACSL
Anchura ventosa accesoria	159	ACSW

[†] Las regiones del cuerpo del pleroceroide se muestran en la Figura 9A. Las variables del escólex son homólogas a las descritas en la Figura 1 del capítulo 4.2 (las abreviaturas usadas en dicho capítulo se muestran en la columna 'Notas').

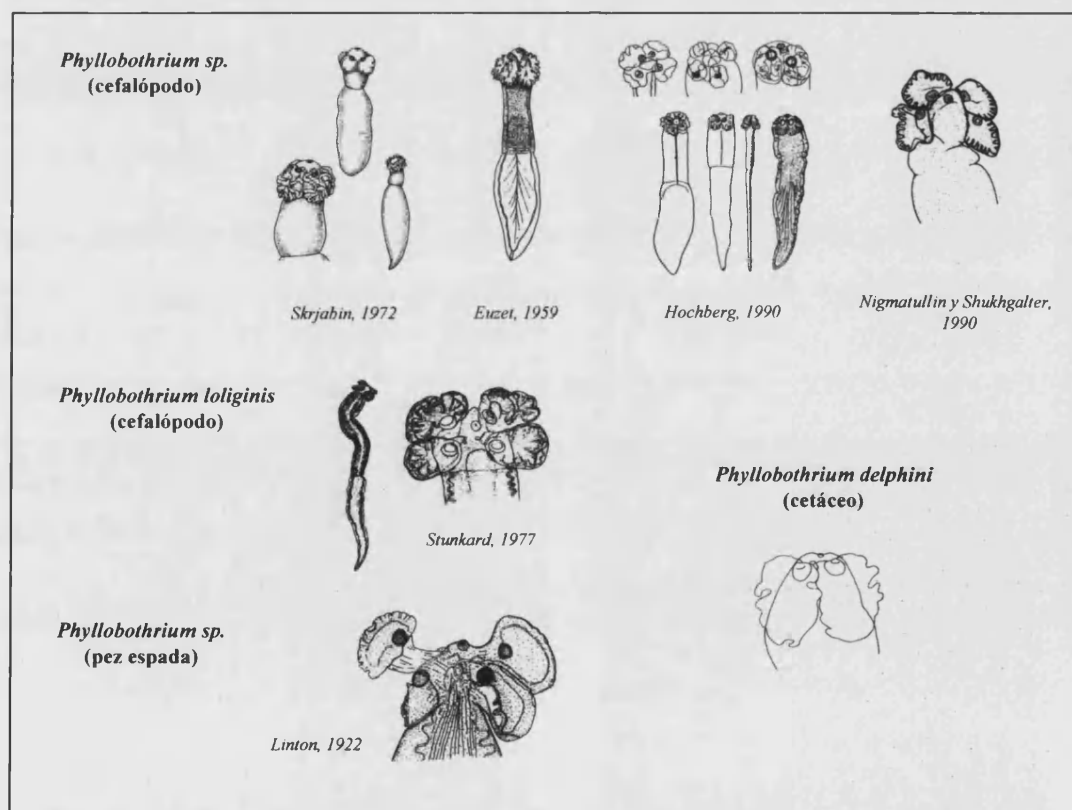
Se utilizó la *pars postica* de este espécimen para el análisis molecular del mismo, obteniéndose una secuencia LSU idéntica a los *P. delphini* de la grasa subcutánea del mismo individuo hospedador (su secuencia no se incluye en los resultados moleculares del capítulo 4.4). Además, este ejemplar del intestino se encontró vivo, y los patrones de movimiento de los botridios fueron idénticos a los observados en ejemplares vivos de *P. delphini* de la grasa del delfín. La morfología del botridio en el espécimen del intestino fue ligeramente diferente al de *P. delphini* de la grasa (Figura 9B de este apéndice y Figura 2A del capítulo 4.2: el borde del botridio es más ondulado y se une más anteriormente a la ventosa accesoria en los de la grasa), y las medidas del escólex del primero fueron en general menores que los de la grasa, excepto la longitud de la región apical del escólex y el diámetro externo e interno del órgano apical (Tabla 1 del capítulo 4.2). Ya que ambas larvas parecen pertenecer a la misma especie, estas diferencias se pueden interpretar como crecimiento de las estructuras del escólex en el desarrollo ontogenético de la larva.

Existen 2 explicaciones posibles a la presencia de un individuo de *P. delphini* en el intestino:

- Este espécimen entró en el delfín en un estado de desarrollo anterior (quizá con una morfología similar a los plerocercoides 'pequeños', como es probable que ocurra en el caso de *P. delphini* de la grasa, ver capítulo 4.4), y por algún motivo no realizó la migración hasta la grasa, sino que comenzó su desarrollo en el intestino.
- Entró en el delfín con la morfología descrita con una de las presas que éste ingirió.

En el análisis del contenido alimenticio de dicho delfín se encontró un único pico de calamar, que correspondió a la especie *Illex coindetti* (Blanco, comunicación personal). La longitud del manto estimada para este cefalópodo fue de 283,6 mm. Esta especie de calamar suele estar parasitada por diversos tipos de larvas tetrafilídeas, siendo la más común una larva nombrada como *Phyllobothrium* sp. (algunos autores la denominan *P. loliginis*, pero parece tratarse en todos los casos del mismo tipo de larva) (Linton, 1922; Stunkard, 1977; Brown y Threlfall, 1968; Pascual *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 1996a,b). En general, estas larvas aparecen frecuentemente (prevalencia mayor a 10%) en calamares de las familias Loliginidae y Ommastrephidae, pero las especies del género *Illex* se encuentran entre las más parasitadas por ese tipo de larva (Tabla 4). Curiosamente, la morfología presentada por *P. delphini* del intestino del delfín es muy similar a la de *Phyllobothrium* sp., y sus medidas corporales y del escólex se encontraron dentro del rango morfométrico habitual de las larvas de cefalópodos (Threlfall, 1970; Nigmatullin y Shukhgalter, 1990; Shukhgalter, 1992; Gestal *et al.*, 1998) (Figura 10).

Figura 10. Morfología general de la larva y detalles del escólex de *Phyllobothrium* sp. y *P. loliginis* de cefalópodos, *Phyllobothrium* sp. de teleósteos depredadores y *P. delphini* de cetáceos.



En el mar Mediterráneo, diversos autores han citado especímenes de *Phyllobothrium* sp. (o *P. loliginis*) en calamares de los géneros *Illex*, *Loligo*, *Todarodes*, *Sepia*, *Octopus* y *Eledone* (Hochberg, 1990 y referencias en el trabajo), pero no existen datos precisos de prevalencia o intensidad de parasitación en este mar. El único estudio detallado sobre la parasitofauna de cefalópodos en el mar Mediterráneo es el de Gestal *et al.* (1999). Estos autores no encontraron larvas tetrafilídeas en el digestivo de los calamares analizados (*Loligo vulgaris* e *Illex coindetii* entre otros). Sin embargo, la mayoría de los ejemplares de estas 2 especies fueron inmaduros, con una longitud del manto menor o igual a 15 cm. *Phyllobothrium* sp. es más común en calamares mayores de 15 cm, cuando su dieta cambia de invertebrados a teleósteos, produciéndose a partir de entonces una acumulación con la edad (Nigmatullin y Shukhgalter, 1990; Pascual *et al.*, 1996b). En el Atlántico nororiental, *I. coindetii* sí aparece habitualmente parasitado por este tipo larvario (Tabla 4).

De acuerdo con estas evidencias, y teniendo en cuenta que es la primera vez que encontramos una larva de este tipo en el intestino de un delfín, la segunda explicación expuesta parece la más probable, es decir, era un parásito del calamar que ingirió el delfín. Un estudio parasitológico detallado de los calamares maduros que habitan el Mediterráneo occidental (con especial énfasis en las especies de la familia Ommastrephidae, Tabla 4) sería necesario para poder contrastar esta hipótesis. Este estudio debería incluir análisis morfológicos, moleculares y ecológicos (prevalencia e intensidad de parasitación) de las larvas tetrafilídeas encontradas.

Skrjabin (1972) encontró en una misma región geográfica larvas de *Phyllobothrium* sp. en calamares y *P. delphini* en cetáceos y sugirió que podrían ser formas homólogas. Esta hipótesis la basó en el gran parecido morfológico del escólex de ambas larvas y en un desarrollo ontogenético similar en ambos tipos de hospedadores (Figura 11). La única diferencia era que en los mamíferos marinos este parásito se hace tisular, adoptando la parte posterior del cuerpo una forma de vesícula más redondeada y presentando una reducción del parénquima en su interior. Otros autores, sin embargo, se han limitado a remarcar el gran parecido del escólex entre *P. loliginis* o *Phyllobothrium* sp. de cefalópodos y *P. delphini* de cetáceos (Linton, 1922; Williams, 1968).

Figura 11. Estados secuenciales de desarrollo de *Phyllobothrium* sp. en el estómago e intestino del calamar y de *Phyllobothrium delphini* en la grasa subcutánea de un cetáceo según Skrjabin (1972).

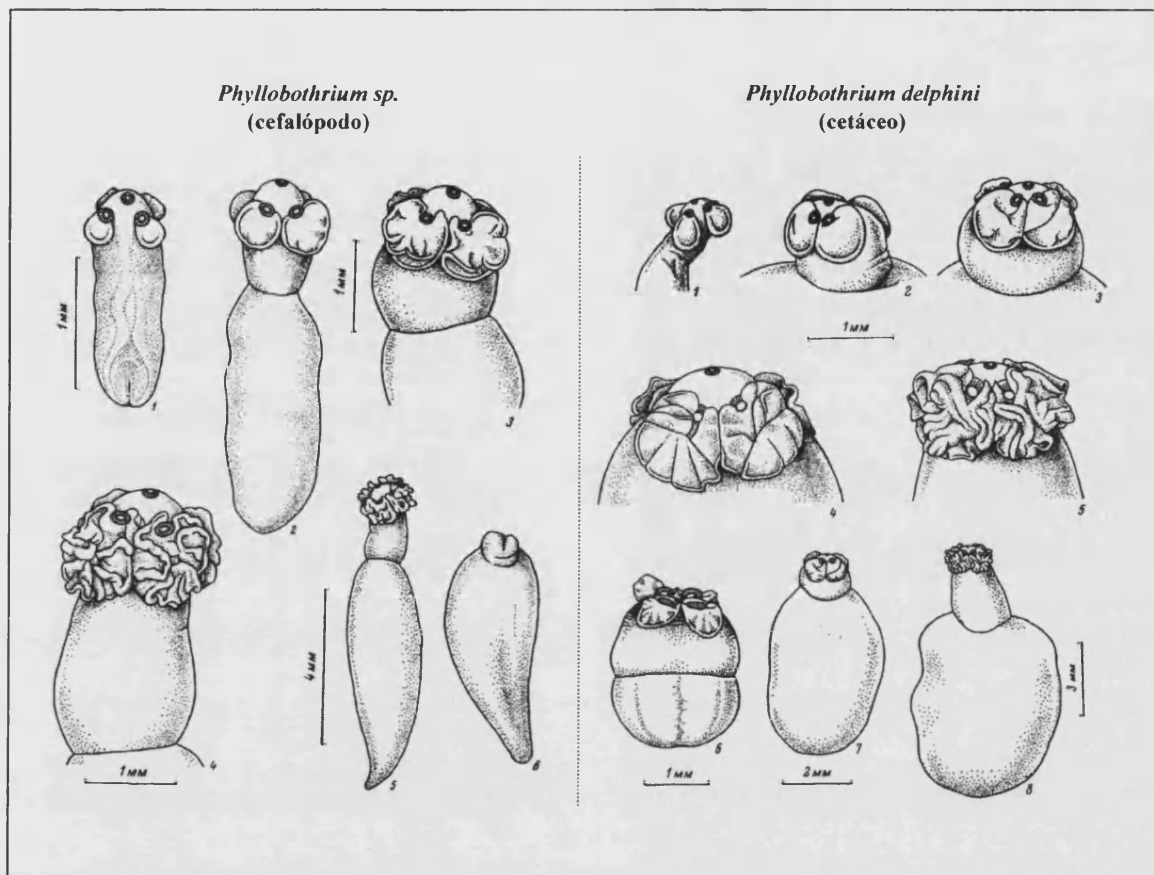


Tabla 4. Datos de infección de *Phyllobothrium* sp. en cefalópodos de las familias Loliginidae y Ommastrephidae. Intensidad de parasitación expresada en media \pm desviación estándar y rango entre paréntesis (cuando sólo se da un valor éste corresponde a la Intensidad media).

Cefalópodo [†]	Prevalencia	Intensidad	Localización	Referencias
LOLIGINIDAE				
<i>Loligo vulgaris</i> *	62,5% (n=8)		Atlántico ibérico	Pascual <i>et al.</i> (1996a)
OMMASTREPHIDAE				
<i>Illex coindetii</i> *	28% (n=300)		Atlántico ibérico	
	68% (n=300)		Mar Cantábrico	
<i>Toradopsis eblanae</i> *	17,7% (n=300)		Atlántico ibérico	
	44,7% (n=300)		Mar Cantábrico	
<i>Todarodes sagittatus</i> *	20% (n=35)		Atlántico ibérico	
	20% (n=30)		Mar Cantábrico	
<i>I. coindetii</i>	45,7% (n=600)	1-115	Costa gallega (Atlántico nororiental)	Pascual <i>et al.</i> (1995)
<i>I. coindetii</i>	45,9% (n=600)	6,13	Costa gallega (Atlántico nororiental)	Pascual <i>et al.</i> (1996b)
<i>T. eblanae</i>	33% (n=591)	2,92		
<i>I. coindetii</i>	32% (n=34)		Irlanda (Atlántico nororiental)	Hochberg (1990)
<i>I. illecebrosus</i>	49% (n=76)			
<i>I. argentinus</i>	50,8% (n=132)		Argentina (Atlántico sudoccidental)	Hochberg (1990)
<i>I. argentinus</i>	40,8% (n=714)	1-36	Sudamérica (Atlántico sudoccidental)	Nigmatullin y Shukhgalter (1990)
<i>I. argentinus</i>	82,3% (n=68)	9,2	Argentina, (Atlántico sudoccidental)	Sardella <i>et al.</i> (1990)
<i>I. illecebrosus</i>	39,6% (n=802)	6,6 (1-41)	Newfoundland, Canadá (Atlántico noroccidental)	Hochberg (1990)
<i>Eucloteuthis luminosa</i>	13,2%	1-4	Aguas oceánicas de Sudamérica	Shukhgalter (1992)
<i>I. argentinus</i>	40,8%	1-36		
<i>Martialia hyadesi</i>	29,5%	1-4		
<i>Martialia hyadesi</i>	47,6% (n=21)	1-4	Atlántico sudoccidental	Hochberg (1990)
<i>Todarodes angolensis</i>	40% (n=18)	1-7	Atlántico sudoccidental	
<i>Ommastrephes bartrami</i> *	94% (n=68)	6,4 \pm 4,5 (1-22)	Norteamérica (Pacífico nororiental)	Bower <i>et al.</i> (1990)
<i>Ommastrephes bartrami</i>	84,2% (n=184)	1-225	Japón (Pacífico noroccidental)	Hochberg (1990)

[†] Sólo se indican los hospedadores que presentaron una prevalencia mayor al 10%.

* Especies de cefalópodos presentes en el mar Mediterráneo; todas son comunes en este mar menos *O. bartrami* (Guerra, 1992; Quetglas *et al.*, 2000).

¿QUÉ IMPLICACIONES PODRÍA TENER ESTA HIPÓTESIS EN EL CICLO VITAL DE LA LARVA?

El estado adulto de las larvas identificadas como *Phyllobothrium* sp. (o *P. loliginis*) de cefalópodos es desconocido. Diversos autores han propuesto a *Clistobothrium tumidum* como su forma adulta a partir del parecido morfológico del escólex, y a los grandes tiburones pelágicos de la familia Lamnidae como sus hospedadores definitivos (Linton, 1922; Stunkard, 1977). Brickle *et al.* (2001) presentó un análisis molecular de larvas tetrafilídeas encontradas en el calamar *Loligo gahi* de las Islas Malvinas. Este autor no describió la morfología de las larvas secuenciadas, pero apuntó que su morfología era muy uniforme y que provisionalmente fueron identificadas como *Phyllobothrium* sp. El análisis genético mostró que 12 de las 13 larvas secuenciadas probablemente pertenecían al género *Clistobothrium*, mientras que la otra apareció cercanamente relacionada con *Ceratobothrium*. Nuestro estudio molecular incluye también las larvas del estudio de Brickle *et al.* (2001) y, como se ha mencionado en el capítulo 4.4, tanto éstas como *P. delphini* de cetáceos parecen ser congénicas de *C. montaukensis* (incluido el individuo de *P. delphini* del intestino del delfín). Existe una gran distancia geográfica que separa los 3 grupos de organismos secuenciados (*P. delphini* de delfines del Mediterráneo, *Phyllobothrium* sp. de *L. gahi* del Atlántico Sur y *C. montaukensis* del Atlántico noroccidental), por lo que es muy probable que cada una represente una especie diferente.

Debido a la gran distancia filogenética y fisiológica entre cefalópodos y mamíferos marinos, lo más parsimonioso sería pensar que una especie de *Clistobothrium* utilice a los calamares en su ciclo vital y otra a los cetáceos. Sin embargo, si el individuo de *P. delphini* encontrado en el intestino del delfín es realmente un parásito habitual de *I. coindetii*, nuestros datos moleculares sugieren que en realidad la misma especie de *Clistobothrium* del Mediterráneo está usando los 2 tipos de hospedadores en su ciclo vital.

Pero ¿qué papel jugarían los cefalópodos y los cetáceos como hospedadores de esta especie de tetrafilídeo? Tanto *I. coindetii* como los cetáceos analizados en el presente trabajo (*S. coeruleoalba*, *T. truncatus* y *G. griseus*):

- Son presas habituales de tiburones lámnidos (cefalópodos: Tabla 5 y 6 del presente apéndice; cetáceos: capítulo 4.4), que a su vez, son los hospedadores definitivos de las especies del género *Clistobothrium*.
- Suelen habitar aguas del final de la plataforma y a lo largo del talud continental (cefalópodos: Quetglas *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003; cetáceos: Tabla 6 del capítulo 4.4), al igual que los hospedadores definitivos.

- En ambos grupos de organismos se han encontrado larvas con un inicio de proglotización (cefalópodos: Euzet, 1959; Brown y Threlfall, 1968; Shukhgalter, 1992; cetáceos: capítulo 4.2 del presente trabajo), por lo que ésta representa la forma infectiva para el hospedador definitivo.

Por tanto, los cefalópodos y los cetáceos podrían estar actuando como hospedadores anteriores al hospedador definitivo.

Tabla 5. Composición estandarizada de la dieta (%) de los tiburones de la familia Lamnidae según Cortés (1999).

Especie *	TE [†]	CE	MO	CR	IN	AM	RM	MM	CO
<i>Carcharodon carcharias</i>	35,5	3,6	0,4	1,8	0,4	1,1	0,4	21,1	35,7
<i>Isurus oxyrinchus</i>	77,1	7,2	0	1,3	0	0	0,2	0,4	13,6
<i>Lamna nasus</i>	74,7	22,7	0	0	1,3	0,7	0	0	0

* Estas 3 especies son las más comunes de la familia Lamnidae en el Mediterráneo.

[†] TE, teleósteos; CE, cefalópodos; MO, otros moluscos; CR, crustáceos decápodos; IN, otros invertebrados; AM, aves marinas; RM, reptiles marinos; MM, mamíferos marinos; CO, condriactos.

Tabla 6. Cefalópodos que forman parte de la dieta de los tiburones de la familia Lamnidae citados en la Tabla 5.

Lamnidos	Cefalópodos *			
<i>Carcharodon carcharias</i>	Loliginidae			
<i>Isurus oxyrinchus</i>	Loliginidae	Sepiidae	Ommastrephidae (<i>Illex</i>)	otros teutoideos
<i>Lamna nasus</i>			Ommastrephidae (<i>Illex</i> , <i>Todarodes</i> , <i>Martialia</i>)	otros teutoideos

* Entre paréntesis aparecen los géneros en los que se ha citado *Phyllobotrium* sp. (o *P. loliginis*) con una prevalencia mayor al 10% y que forman parte de la dieta de estos tiburones.

Referencias: Cliff *et al.*, 1996; Compagno, 2001; Joyce *et al.*, 2002; Cherel y Duhamel, 2004.

Si la presencia de la misma especie de tetráfilídeo en cefalópodos y cetáceos es un hecho generalizado en otras regiones geográficas, se podría sugerir que la incorporación de los mamíferos marinos en el ciclo vital de esta especie tetráfilídea debió ocurrir por procesos de ‘incorporación lateral’, y no por ‘incorporación inferior’ (ver capítulo 4.4 para más información). La ‘incorporación lateral’ se da cuando un parásito explota más de una especie hospedadora en un estado determinado de su ciclo vital (Parker *et al.*, 2003a), en este caso, en el estado larvario infectivo para el hospedador definitivo, de forma que mantiene a su hospedador ancestral (el

calamar) más el que incorporó posteriormente (el delfín). Por tanto, esta hipótesis sugiere que los cetáceos no son hospedadores obligatorios para completar el ciclo vital de esta especie tetrafilídea, y que ésta tiene 2 posibles rutas para llegar al hospedador definitivo.

A lo largo del presente trabajo se han utilizado los términos ‘hospedador intermediario’ y ‘paraténico’ según las definiciones clásicas: el hospedador intermediario es un hospedador obligado para completar el ciclo vital de un parásito, en el cual éste experimenta algún tipo de cambio morfológico o de desarrollo; el hospedador paraténico, en cambio, no es siempre obligatorio para completar el ciclo vital y en él el parásito no sufre ningún tipo de desarrollo, pero suelen utilizarse como puentes ecológicos o tróficos aumentando la probabilidad de transmisión al siguiente hospedador (Bush *et al.*, 2001).

P. delphini sufre un cambio morfológico en el interior del cuerpo de los cetáceos transformándose en merocercoide. En los cefalópodos, *Phyllobothrium sp.* no adquiere esta morfología merocercoide, pero parece que sí experimenta un desarrollo, ya que muchas larvas aparecen con el escólex bastante desarrollado (el plegamiento de los botridios se hace evidente) y algunos presentan inicios de estrobilación (Euzet, 1959; Skrjabin, 1972). Por tanto, si en ambos hospedadores se produce un cambio morfológico de la larva, cetáceos y cefalópodos estarían actuando como hospedadores intermediarios en el mismo nivel del ciclo vital del parásito. Sin embargo, esto implicaría que cetáceos o cefalópodos, o los dos, no son obligatorios para completar el ciclo vital del parásito, comportándose entonces como un tipo especial de hospedador intermediario no obligatorio para completar el ciclo vital del parásito.

PERO, ¿QUÉ VENTAJA TIENE MANTENER DOS POSIBLES RUTAS AL HOSPEDADOR DEFINITIVO?

Estas larvas aparecen en los calamares con una prevalencia e intensidad de parasitación menores que en algunos cetáceos (como el delfín listado) (Tabla 4 de este apéndice y Tabla 3 del capítulo 4.4), entonces, ¿por qué sería ventajoso para este tetrafilídeo mantener ambos tipos de hospedadores en su ciclo vital? Las 3 especies de tiburones de la familia Lamnidae habituales en el Mediterráneo, el tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*), el marrajo dientuso (*Isurus oxyrinchus*) y el marrajo sardinero (*Lamna nasus*) se alimentan de una amplia variedad de organismos marinos, como teleósteos, cefalópodos, condriactos y mamíferos marinos, pero existe una predilección por ciertos tipos de presas según la especie de tiburón (Tabla 5). Por otro lado, en estos tiburones se produce un cambio ontogenético en la dieta, de forma que los teleósteos y cefalópodos tienen una importancia mayor en los juveniles (Linton, 1922; Compagno, 2001; Joyce *et al.*, 2002). Estos tiburones están parasitados por varias especies de cestodos tetrafilídeos del género *Clistobothrium*,

y una de ellas, *C. tumidum*, ha sido citada en el Mediterráneo. Esta especie parece no presentar una gran especificidad por su hospedador definitivo, ya que ha sido citada en 2 especies de tiburones de la familia Lamnidae, *C. carcharias* e *I. oxyrinchus* (Linton, 1922; Euzet, 1959; Ruhnke, 1993).

Por tanto, para la estrategia vital de esta especie de tetrafilídeo sería muy beneficioso poder parasitar en su estado larvario (e infectivo para el hospedador definitivo) a una amplia gama de organismos, ya que:

- No presenta una especificidad muy acusada por sus hospedadores definitivos.
- La dieta de éstos es bastante variada.
- Existen diferencias en la dieta entre las distintas especies de tiburones que pueden actuar como sus hospedadores definitivos.
- Se produce un cambio ontogenético en la dieta de estos hospedadores.

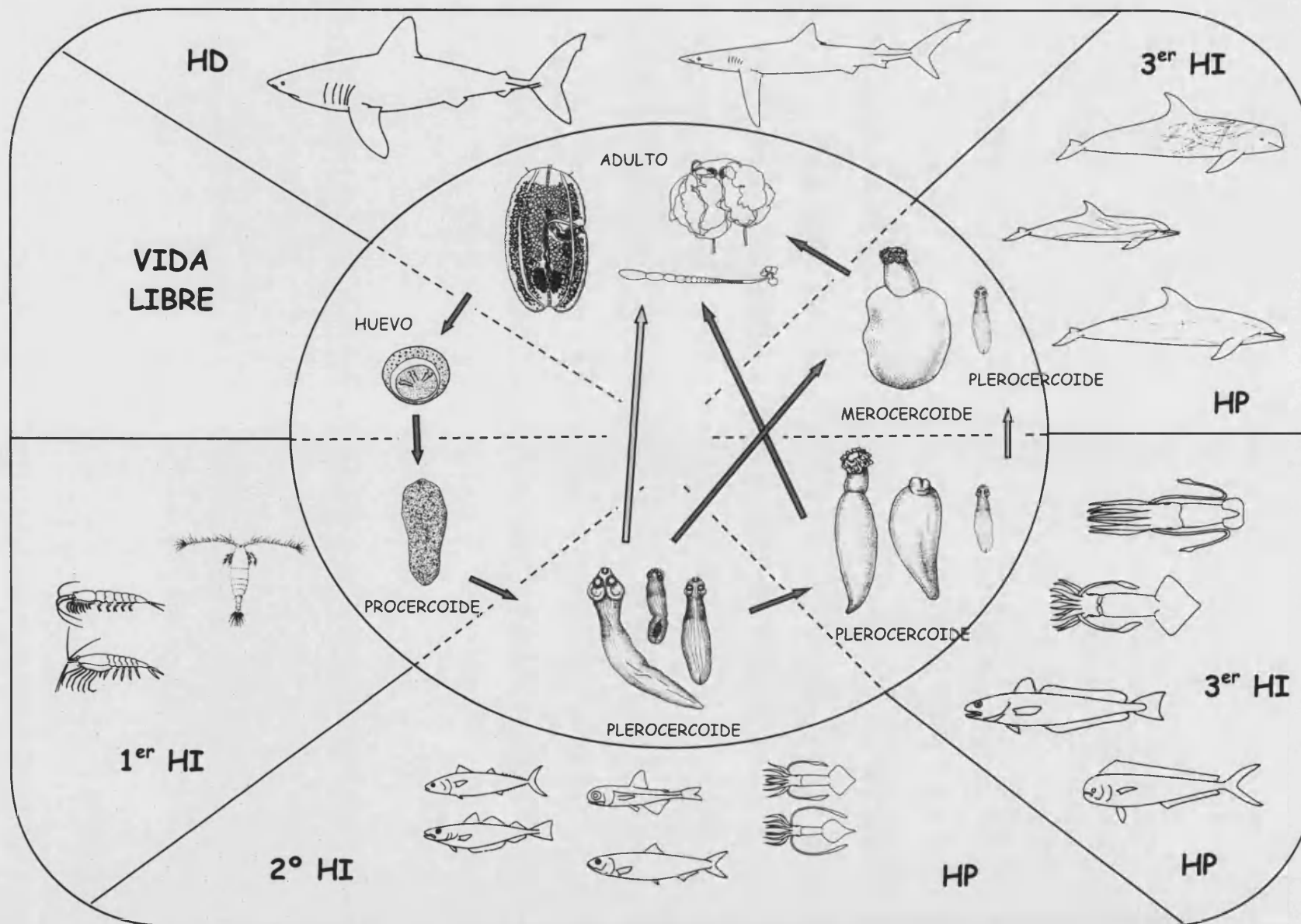
En el caso concreto de los cefalópodos y cetáceos, a *C. tumidum* le convendría mantener a los primeros en su ciclo vital para poder seguir parasitando a *I. oxyrinchus* y a juveniles de *C. carcharias*, que no suelen alimentarse de mamíferos marinos (ver Tabla 5).

En esta línea, Linton (1922) analizó diferentes peces y cefalópodos de la misma localidad geográfica (Massachusetts, Atlántico noroccidental) y encontró adultos de *C. tumidum* en 2 especies de tiburones, *C. carcharias* e *I. oxyrinchus*, y *P. loliginis* en el tracto digestivo de cefalópodos, teleósteos y condriktios. Registró unas prevalencias de parasitación de *P. loliginis* mayores al 10% en los calamares *Ommastrephes (Illex) illecebrosus* y *Loligo pealeii*, los condriktios *Mustelus canis*, *Squalus acanthias* y *Raja ocellata*, y los teleósteos *Thunnus thunnis*, *Xyphias gladius*, *Phycis chuss* y *Paralichthys oblongus*. Además, detectó la presencia de teleósteos, calamares y un condriktio, *Squalus acanthias*, en el aparato digestivo de los ejemplares de *C. carcharias* e *I. oxyrinchus* analizados por él y parasitados por *C. tumidum*. En base a estos datos y a la similitud morfológica del escólex de *P. loliginis* y *C. tumidum* propuso al primero como la fase anterior de desarrollo del segundo. Aunque no hay pruebas moleculares que demuestren que se trata en todos los casos de la misma especie de tetrafilídeo, las evidencias morfológicas y ecológicas apoyan esta hipótesis.

CICLO VITAL HIPOTÉTICO DE LOS TETRAFILÍDEOS DE CETÁCEOS

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y a las últimas hipótesis planteadas, en la Figura 12 se propone un ciclo vital hipotético para *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercóide ‘grande’ (se representa sólo a *P. delphini* y a algunos plerocercóides por cuestiones de economía de espacio). En el ‘Apéndice 2’ se especifican diversos estudios que permitirían resolver algunos de sus puntos.

Figura 12. Ciclo vital hipotético de *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercarioide 'grande' en base a los resultados e hipótesis del presente trabajo (dibujos extraídos de: Euzet, 1959; Skrjabin, 1972; Ruhnke, 1993; Notarbartolo Di Sciara y Demma, 1997; Notarbartolo Di Sciara y Bianchi, 1998).



8. APÉNDICE 2. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados del presente trabajo han elucidado muchas de las cuestiones planteadas hasta la fecha sobre las larvas tetrafilídeas que normalmente parasitan a los mamíferos marinos, como diversos aspectos morfológicos, la relación entre las larvas y su identidad taxonómica o el papel de estos hospedadores en el ciclo vital de *P. delphini* y *M. grimaldii*. Sin embargo, existen otras cuestiones fundamentales que no han podido ser resueltas completamente, como la identidad específica de las larvas, el estado plerocercoides de *P. delphini*, la ontogenia y rutas de migración dentro del hospedador de las formas quísticas o el significado ecológico de las infestaciones del plerocercoides ‘grande’.

Para resolver algunas de estas cuestiones sugerimos la realización de los siguientes estudios:

- El análisis **molecular** de un número elevado de **plerocercoides ‘pequeños’** del colon terminal y estómago pilórico sería necesario para confirmar que se trata de una fase anterior de *M. grimaldii* y de *P. delphini*.
- Un estudio histológico detallado de las paredes del estómago pilórico y el colon terminal ayudaría a averiguar la **ruta de migración** que siguen los **plerocercoides** a través del **cuerpo del cetáceo** para alcanzar las localizaciones donde *P. delphini* y *M. grimaldii* aparecen. También deberían revisarse los vasos sanguíneos y linfáticos que irrigan y drenan estas zonas del digestivo, así como los principales vasos corporales y el corazón. Las larvas encontradas en estas localizaciones deberían secuenciarse y compararse con las secuencias de los merocercoides y plerocercoides.
- Para completar algunos resultados sobre la **ecología** de estas larvas en los cetáceos se sugieren los siguientes estudios:
 - **Delfín mular:** Deberían analizarse más animales para comprobar que la ausencia de plerocercoides ‘grandes’ en los conductos hepatopancreáticos es real y no debida a un bajo tamaño muestral. Además, sería necesario analizar todos los intestinos disponibles de esta especie para confirmar que se da el mismo patrón de infestación de plerocercoides que en el delfín listado y el calderón gris.
 - **Zifio de Cuvier:** sería conveniente el análisis del hígado y páncreas de ejemplares de esta especie para investigar la presencia/ausencia de los plerocercoides ‘grandes’, así como la inspección regular de la grasa subcutánea, peritoneo y mesenterios para descubrir *P. delphini* y *M. grimaldii*.
 - **Delfín listado:** Se debería obtener un cálculo más exacto de la intensidad de parasitación de *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercoides ‘grande’ mediante un

aumento del tamaño muestral. Así mismo, sería también conveniente recopilar más datos de este tipo en el delfín mular y calderón gris. De este modo, se podrían comparar con más exactitud las intensidades de parasitación entre especies de delfines y con las de las larvas de cefalópodos del Mediterráneo occidental.

▪ **Identidad específica de las 3 especies de larvas y estudio completo de su ciclo vital en el Mediterráneo.**

El mar Mediterráneo es un mar semicerrado y relativamente pobre en especies. Por tanto, las redes tróficas que se establecen en él deben ser comparativamente más sencillas que en océanos o mares más abiertos. El análisis parasitológico de los distintos hospedadores relacionados tróficamente debería proporcionar los datos necesarios para completar, por vez primera, el ciclo vital de estos tetrafilídeos. En este análisis parasitológico se deberían realizar estudios morfológicos, moleculares y ecológicos (prevalencia e intensidad) de los cestodos encontrados. Además, el estudio de las redes tróficas que implicaran al delfín listado resultaría más efectivo, ya que es la especie que ha presentado una mayor frecuencia e intensidad de parasitación. Por tanto, los pasos a seguir podrían ser los siguientes:

1. La obtención de datos morfológicos, ecológicos y moleculares de **formas adultas** de especies mediterráneas de tetrafilídeos. Deberían analizarse en primer lugar aquellos **tiburones** que han sido citados como predadores frecuentes y/o carroñeros probables de cetáceos, es decir, las 3 especies de la familia Lamnidae habituales en el Mediterráneo (*Carcharodon carcharias*, *Isurus oxyrinchus* y *Lamna nasus*), la tintorera (*Prionace glauca*), la cañabota gris (*Hexanchus griseus*), el tiburón gris o de Milberto (*Carcharhinus plumbeus*) y la pailona (*Centroscymnus coelolepis*). La comparación de las secuencias de las formas adultas con las de *P. delphini*, *M. grimaldii* y el plerocercóide ‘grande’ permitirá la identificación específica de estas larvas.
2. El **análisis parasitológico** de los **cefalópodos** que forman parte de la **dieta** de los **tiburones** del Mediterráneo, especialmente de aquellos que han sido citados como hospedadores de *Phyllobothrium* sp. (o *P. loliginis*).
3. El **análisis parasitológico** de los **teleósteos y cefalópodos** que forman parte de la **dieta** de los **delfines listados** del Mediterráneo, en especial de los peces mictófidios, ya que son sus presas más habituales.
4. El estudio del **contenido alimenticio** de los **peces y/o cefalópodos** que actúen como hospedadores anteriores a los delfines podría indicar en qué organismos buscar el estado anterior de desarrollo de los plerocercoides de peces y/o cefalópodos.

Es importante conocer el ciclo vital completo de estos cestodos marinos porque podría ayudar a entender el funcionamiento del ecosistema donde éste se desarrolla. El ambiente marino pelágico es difícil de estudiar, y en especial las complejas relaciones tróficas que se establecen entre los organismos que lo habitan. El estudio del ciclo vital de las especies de cestodos que parasitan hospedadores pelágicos permite el seguimiento de las larvas a través de la red trófica marina, sirviendo como marcadores biológicos de las relaciones tróficas más habituales que se establecen entre los distintos organismos marinos (Nigmatullin y Shukhgalter, 1990; Pascual *et al.*, 1996b; Brickle *et al.*, 2001). Este tipo de estudios sirve como complemento indispensable a los estudios de alimentación, ya que en muchos casos éstos no son suficientes para establecer el comportamiento alimenticio natural de los hospedadores debido a las características biológicas y comportamentales de algunos de ellos (por ejemplo, en los estudios de alimentación de diversas especies de tiburones, bastantes ejemplares suelen aparecer con el estómago evertido o vacío; Carrassón *et al.*, 1992; Cliff *et al.*, 1996; McCord y Campana, 2003; Wetherbee y Cortés, 2004).

Finalmente, recomendamos que se siga analizando de forma rutinaria la parasitofauna de los cetáceos varados en las costas del levante español con el fin de detectar posibles cambios en las frecuencias y/o intensidades de parasitación de las larvas tetrafilídeas analizadas en el presente trabajo. Estos cambios podrían constituir un indicador natural de la evolución de las redes tróficas marinas. Este control es especialmente importante ya que están implicadas poblaciones de cetáceos amenazadas, algunas de ellas protegidas por leyes españolas y europeas, como las del delfín mular.



REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

- Aguilar-Aguilar, R., Moreno-Navarrete, R. G., Salgado-Maldonado, G. y Villa-Ramírez, B. (2001) Gastrointestinal helminths of spinner dolphins *Stenella longirostris* (Gray, 1828) (Cetacea: Delphinidae) stranded in La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico. *Comparative Parasitology*, 68: 272-274.
- Aguilar, A. y Raga, J.A. (1993) The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio*, 22 (8): 524-528.
- Avdeeva, N.V., y. Avdeev, V.V. (1980) Peculiarities of morphogenesis of adhesive organs of some plerocercoids of the collective genus *Scolex* (Tetraphyllidea) and their identification. *Parazitologiya*, 14: 242-250 [en Ruso].
- Avdeeva, N.V. y Avdeev, V.V. (1989) Plerocercoids of the cestodes of order Tetraphyllidea (problems in identification). *Biologo-poshvennyi Institut DVO AN SSSR, Vladivostok, Russia*, 74 pp. [en Ruso].
- Aznar, F.J., Balbuena, J.A. y Raga, J.A. (1994) On the identity and emigration of *Scolex pleuronectis* larvae (Cestoda) in the striped dolphin. *European Research on Cetaceans*, 8: 243-246.
- Baer, J.G. (1932) Contribution à l'étude des Cestodes de Cétacés. *Revue Suisse de Zoologie*, 39: 195-228.
- Balbuena, J.A. (1991) Estudio taxonómico y ecológico de la parasitofauna del calderón común, *Globicephala melas* (Traill, 1809), en las aguas de Europa. Ph. D. thesis, University of Valencia.
- Berta, A. (2002) Pinniped Evolution. En: *Encyclopedia of Marine Mammals*. (eds. Perrin, W.F., Würsig, B. y Thewissen, J.G.M.). Academic Press, San Diego. pp. 921-929.
- Best, P.B. y Abernethy, R.B. (1994) Heaviside's dolphin *Cephalorhynchus heavisidii* (Gray, 1828). En: *Handbook of marine mammals*. Vol. 5: The first book of dolphins. (eds. Ridgway, S.H. y Harrison, S.R.). Academic Press. pp. 289-310.
- Bester, M.N. (1989) Endoparasites of the subantarctic fur seal *Arctocephalus tropicalis* from Gough Island. *South African Journal of Zoology*, 24: 363-365.
- Blanco, C., Aznar, J. y Raga, J.A. (1995) Cephalopods in the diet of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from the Western Mediterranean during an epizootic in 1990. *Journal of Zoology, London*, 237: 151-158.
- Blanco, C., Raduán, A., Fernández, M. y Raga, J.A. (2005) Niche separation of four odontocetes in the Western Mediterranean Sea. En: *Abstract Book of the 19th Annual conference of the European Cetacean Society*. 2nd-7th April 2005, La Rochelle, France. Pp. 82.
- Blanco, C., Raduán, A. y Raga, J.A. (2006) Diet of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) in the Western Mediterranean Sea. *Scienza Marina*, 70(3): 407-411.
- Blanco, C. y Raga, J.A. (2000) Cephalopod prey of two *Ziphius cavirostris* (Cetacea) stranded on the Western Mediterranean coast. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, 80: 381-382.
- Blanco, C., Salomón, O. y Raga, J.A. (2001) Diet of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, 81: 1053-1058.
- Bower, S.M., Margolis, M. y Yang, D.T.C. (1990) A preliminary investigation of the helminth parasites of flyins squid, (*Ommastrephes bartrami*), in Northeastern Pacific waters and comparison with other parasites surveys of Ommastrephidae. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1750: 1-19.
- Brickle, P., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Bishop A. y Arkhipkin A.I. (2001) Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 2289-2296.
- Brown, E.L. y Threlfall, W. (1968) Helminth parasites of the Newfoundland short-finned squid, *Illex illecebrosus* (LeSueur) (Cephalopoda: Decapoda). *Canadian Journal of Zoology*, 46(6): 1087-1093.
- Brown, S.P., Renaud, F., Guégan, J.F. y Thomas, F. (2001) Evolution of trophic transmission in parasites: the need to reach a mating place? *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 815-820.
- Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W. and Seed, J.R. (2001) Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, UK. 566 pp.

- Caira, J.N. (1992) Verification of multiple species of *Pedibothrium* in the Atlantic nurse shark with comments on the Australasian members of the genus. *Journal of Parasitology*, 78: 289-308.
- Caira, J. N., Jensen, K. y Healy, C. J. (1999) On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Systematic Parasitology*, 42: 77-151.
- Caira, J.N., Jensen, K. y Healy, C.J. (2001) Interrelationships among tetraphyllidean and lecanicephalidean cestodes. En: *Interrelationships of the Platyhelminthes*. (eds. Littlewood, D.T.J. y Bray, R.). London: Taylor and Francis. pp. 135-158.
- Caira, J.N. y Reyda, F.B. (2005) Helminth parasites Eucestoda (true tapeworms). En: *Marine Parasitology*. (ed. Rohde, K.). CABI Publishing. pp. 92-104.
- Caira, J.N. y Ruhnke, T.R. (1991) A comparison of scolex morphology between the plerocercoid and the adult of *Calliobothrium verticilatum* (Tetraphyllidea: Onchobothriidae). *Canadian Journal of Zoology*, 69: 1484-1488.
- Caira, J.N. y Tracy, R. (2002) Two new species of *Yorkeria* (Tetraphyllidea: Onchobothriidae) from *Chiloscyllium punctatum* (Elasmobranchii: Hemiscylliidae) in Thailand. *Journal of Parasitology*, 88: 1172-1180.
- Carrassón, M., Stefanescu, C. y Cartes, J.E. (1992) Diets and bathymetric distributions of two bathyal sharks of the Catalan deep sea (Western Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, 82: 21-30.
- Casado, N., Moreno, M.J., Urrea-Paris, M.A. y Rodríguez-Caabeiro, F. (1999) Ultrastructural study of the papillae and presumed sensory receptors in the scolex of the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid (Cestoda: Trypanorhyncha). *Parasitology Research*, 85: 964-973.
- Chambers, C.B., Cribb, T.H. y Jones M.K. (2000) Tetraphyllidean metacestodes of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of *in vitro* cultivation to identify them. *Folia Parasitologica*, 47: 285-292.
- Cherel, Y. y Duhamel, G. (2004) Antarctic jaws: cephalopod prey of sharks in Kerguelen waters. *Deep- Sea Research I*, 51: 17-31.
- Chervy, L. (2002) The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology*, 52:1-33.
- Cliff, C., Dudley, S.F.J. y Jury M.R. (1996) Catches of white sharks in Kwa Zulu-Natal, South Africa and environmental influences. En: *Great White Sharks. The Biology of Carcharodon carcharias*. (eds. Klimley, A.P. y Ainley, D.G.). Academic Press. pp. 351-362.
- Colom-Llavina, M.M. (2005) Metazoan parasites of marine mammals from the Caribbean and the western coast of North America. Unpublished Master Thesis, Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 86 pp.
- Compagno, L.J.V. (2001) Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 1, Vol. 2. Rome, FAO. 269p.
- Corcuera, J., Monzón, F., Aguilar, A., Borrell, A. y Raga, J.A. (1995) Life history data, organochlorine pollutants and parasites from eight Burmeister's porpoises, *Phocoena spinipinnis*, caught in northern Argentine waters. En: *Biology of the Phocoenids*. (eds. Bjorge, A. y Donovan, G.P.). Report of the International Whaling Commission. Special Issue 16, 365-372.
- Cortés, E. (1999) Standardized diet composition and trophic levels of sharks. *ICES Journal of Marine Science*, 56: 707-717.
- Cowan, D.F. y Smith, T.L. (1999) Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of Anatomy*, 194: 505-517.
- Dailey, M.D. (1985) Diseases of Mammalia: Cetacea. En: *Diseases of Marine Animals*. Vol. IV, Part 2. (ed. Kinne, O.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany. pp. 805-847.
- Dailey, M.D. y Brownell, R.L. (1972) A checklist of marine mammal parasites. En: *Mammals of the Sea. Biology and Medicine*. (ed. Ridgway, S.H.). C.C. Thomas Publisher, USA. pp. 528-589.
- Dailey, M.D. y Vogelbein, W. (1990) *Clistobothrium carcharodoni* gen. et sp. n. (Cestoda: Tetraphyllidea) from the spiral valve of the great white shark (*Carcharodon carcharias*). *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 57: 108-112.

- Delyamure, S.L. (1955) *Helminth Fauna of Marine Mammals (Ecology and Phylogeny)*. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, Russia. (English translation by M. Raveh, 1968. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel). 192-203 pp.
- Dollfus, R.P.H. (1964) A propos de la récolte à Banyuls d'un cystique de Cestode chez *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Les cystiques des cestodes chez les cétacés et pinnipèdes. *Vie Milieu*, 17 : 177-204.
- Euzet, L. (1959) *Recherches sur les cestodes tétraphyllides des sélaciens des côtes de France*. Ph. D. Thesis, University of Montpellier.
- Euzet, L. (1994) Order Tetrphyllidea Carus, 1863. En: *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. (eds. Khalil, L.F., Jones, A. y Bray, R.A.). Wallingford: CAB International. pp. 149-194.
- Fergusson, I.K. (1996) Distribution and autecology of the white shark in the eastern North Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. En: *Great White Sharks: The Biology of Carcharodon carcharias*. (eds. Klimley, A.P. y Ainley D.G.). Academic Press, San Diego. pp. 321-345.
- Fergusson, I.K., Compagno, L.J.V. y Marks, M.A. (2000) Predation by white sharks *Carcharodon carcharias* (Chondrichthyes: Lamnidae) upon chelonians, with new records from the Mediterranean Sea and a first record of the ocean sunfish *Mola mola* (Osteichthyes: Molidae) as stomach contents. *Environmental Biology of Fishes*, 58: 447-453.
- Fordyce, R.E. (2002) Cetacean Evolution. En: *Encyclopedia of Marine Mammals*. (eds. Perrin, W.F., Würsig, B. y Thewissen, J.G.M.). Academic Press, San Diego. pp. 214-220.
- Forrester, D.J., Odell, D.K., Thompson, N.P. y White, J.R. (1980) Morphometrics, parasites and chlorinated hydrocarbon residues of pygmy killer whales from Florida. *Journal of Mammalogy*, 61: 356-360.
- Freeman, R. S. (1973) Ontogeny of cestodes and its bearing on their phylogeny and systematics. *Advances in Parasitology*, 11: 401-557.
- Gabrion, C. y Euzet-Sicard, S. (1979) Étude du tégument et des récepteurs sensoriels du scolex d'un plérocercóide de Cestode Tetrphyllidea. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 54: 573-583.
- Garippa, G., Scala, A. y Pais, A. (1991) *Phyllobothrium delphini* and *Pennella* sp. in a dolphin of the species *Stenella coeruleoalba*. *Bollettino della Società Italiana di Patologia Ittica*, 6: 19-24.
- George-Nascimento, M.G. y Carvajal, J. (1981) Helmintos parásitos del lobo marino común *Otaria flavescens* en el Golfo de Arauco, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 36: 72-73.
- Geraci, J.R. y Aubin, D.J.St. (1987) Effects of parasites on marine mammals. *International Journal for Parasitology*, 17(2): 407-414.
- Geraci, J.R. y Lounsbury, V.J. (1993) *Marine mammals ashore. A field guide for strandings*. Texas A&M University Sea Grant College Program, Galveston, Texas. 305 pp.
- Gestal, C., Abollo, E., Arias, C. y Pascual, S. (1998) Estudio al M.E.B. de larvas plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. (Tetrphyllidea, Phyllobotriidae) y *Nybelinia lingualis* (Trypanorhyncha, Tentaculariidae), cestodos parásitos de *Octopus vulgaris* (Molusco, Cephalopoda) en la Ría de Vigo. *Sociedad Española de Malacología*, 16(1): 125-132.
- Gestal, C., Belcari, P., Abollo E. y Pascual, S. (1999) Parasites of cephalopods in the Northern Tyrrhenian Sea (Western Mediterranean): new host records and host specificity. *Scientia Marina*, 63(1): 39-43.
- Gibson, D.I., Harris, E.A., Bray, R.A., Jepson, P.D., Kuiken, T., Baker, J.R. y Simpson, V.R. (1998) A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990-1994. *Journal of Zoology, London*, 244: 563-574.
- Gómez de Segura, A., Crespo, E.A., Pedraza, S.N., Hammond, P.S. y Raga, J.A. (en prensa) Abundance of small cetaceans in waters of the central Spanish Mediterranean. *Marine Biology*.
- Gómez de Segura, A., Tomás, J. y Raga, J.A. (2004) Sector centro (Comunidad Valenciana y Murcia). En: *Proyecto Mediterráneo: Zonas de especial interés para la conservación de los cetáceos en el Mediterráneo español*. (eds. Raga, J.A. y Pantoja, J.). Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. pp. 67-131.
- González, A.F., Pascual, S., Gestal, C., Abollo, E. y Guerra, A. (2003) What makes a cephalopod a suitable host for parasite? The case of Galician waters. *Fisheries Research*, 60: 177-183.

- Guerra, A. (1992) *Fauna Ibérica. Vol. 1: Mollusca: Cephalopoda*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Madrid. 327 pp.
- Guiart, M. J. (1935) Cestodes parasites provenant des campagnes scientifiques du Prince Albert 1^{er} de Monaco. *Résultats des Campagnes Scientifiques du Prince de Monaco*, Monaco, 91 : 1-105.
- Heithaus, M.R. (2001) Predator-prey and competitive interactions between sharks (order Selachii) and dolphins (suborder Odontoceti): a review. *Journal of Zoology, London*, 253: 53-68.
- Hamilton, K.A. y Byram, J.E. (1974) Tapeworm development: the effects of urea on a larval tetraphyllidean. *Journal of Parasitology*, 60: 20-28.
- Hoberg, E.P., Gardner, S.L. y Campbell, R.A. (1999) Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Systematic Parasitology*, 42: 1-12.
- Hochberg, F.G. (1990) Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases Caused by Protistans and Metazoans. En: *Diseases of Marine Animals. Vol. III. Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinoderma, Urochordata*. (ed. Kinne, O.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany. pp. 47-202.
- Hoelzel, A.R., Potter, C.W. y Best, P.B. (1998) Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *Proceedings of the Royal Society B, London*, 265: 1177-1183.
- Jarecka, L. y Burt, M.D.B. (1984) The cercoid larvae of *Pseudanthobothrium hansenii* Baer, 1956 and *Pseudanthobothrium* sp. (Cestoda, Tetraphyllidea) from experimentally infected harpacticoid copepods. *Acta Parasitologica Polonica*, 29: 23-26.
- Johnston, T.H. y Mawson, P.M. (1939) Internal parasites of the pigmy sperm whale. *Records of the South Australian Museum*, 6: 263-274.
- Joyce, W.N., Campana, S.E., Natanson, L.J., Kohler, N.E., Pratt Jr, H.L. y Jensen, C.F. (2002) Analysis of stomach contents of the porbeagle shark (*Lamna nasus* Bonnaterre) in the northwest Atlantic. *Journal of Marine Science*, 59: 1263-1269.
- Khalil, A.I. (1995) Scanning and transmission electron microscopical studies of the tegument and parenchyma of tetraphyllid pleurocercoid. *Journal of the Egyptian German Society of Zoology*, 18: 19-41.
- Lauckner, G. (1985) Diseases of Mammalia: Pinnipedia. En: *Diseases of Marine Animals. Vol. IV, Part 2*, (ed. Kinne, O.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany. pp. 683-793.
- Linton, E. (1905) Notes on cestode cyst, *Taenia chamissonii*, new species, from a porpoise. *Proceedings of the United States National Museum*, 28: 819-823.
- Linton, E. (1922) A new cestode from the manatee and mackerel sharks. *Proceedings of the United States National Museum*, 61: 1-16.
- Long, D.J. y Jones, R.E. (1996) White shark predation and scavenging on cetaceans in the eastern North Pacific Ocean. En: *Great White Sharks: The Biology of Carcharodon carcharias*. (eds. Klimley, A.P. y Ainley D.G.). Academic Press, San Diego. pp. 293-307.
- Machida, M. (1974) Helminth parasites of the True's porpoise, *Phocoenoides truei* Andrews. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo*, 17(3): 221-227.
- Martin, R.A., Hammerschlag, N., Collier, R.S. y Fallows, C. (2005) Predatory behaviour of white sharks (*Carcharodon carcharias*) at Seal Island, South Africa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 1121-1135.
- McAlpine, D.F., Murison, L.D. y Hoberg, E.P. (1997) New records for the pygmy sperm whale, *Kogia breviceps* (Physeteridae) from Atlantic Canada with notes on diet and parasites. *Marine Mammal Science*, 13: 701-704.
- McColl, K.A. y Obendorf, D.L. (1982) Helminth parasites and associated pathology in stranded Fraser's dolphins, *Lagenodelphis hosei* (Fraser, 1956). *Aquatic Mammals*, 9(2): 30-34.
- McCord, M.E. y Campana, S.E. (2003) A quantitative assessment of the diet of the blue shark (*Prionace glauca*) off Nova Scotia, Canada. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 32: 57-63.

- Mendonça, M.M. (1984) *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) (Cestoda, Tetraphyllidea) from *Arctocephalus pusillus* (Schreber, 1778) (Carnivora, Otariidae) in captivity. *Revista Iberica de Parasitologia*, 44: 39-44.
- Mudry, D.R. y Dailey, M.D. (1971) Postembryonic development of certain tetraphyllidean and trypanorhynch cestodes with a possible alternative life cycle for the order Trypanorhyncha. *Canadian Journal of Zoology*, 49: 1249-1253.
- Nigmatullin, Ch.M. y Shukgálter, O.A. (1990) Helmitofauna y aspectos ecológicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el Atlántico sudoccidental. *Frente Marítimo*, 7 (Sec. A): 57-68.
- Norman, R.J. de B. (1997) Tetraphyllidean Cysticerci in the peritoneal cavity of the common dolphin. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4): 891-895.
- Notarbartolo Di Sciara, G. y Bianchi, I. (1998) Guida degli Squali e delle Razze del Mediterraneo. Franco Muzzio Editore. 388 pp.
- Notarbartolo Di Sciara, G. y Demma, M. (1997) Guida dei Mammiferi Marini del Mediterraneo. Franco Muzzio Editore. 264 pp.
- Palm, H.W., Poynton, S.L. y Rutledge, P. (1998) Surface ultrastructure of plerocercoids of *Bombycirhynchus phyraenaicum* (Pintner, 1930) (Cestoda: Trypanorhyncha). *Parasitology Research*, 84:195-204.
- Parker, G.A., Chubb, J.C., Ball, M.A. y Roberts, G.N. (2003a) Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature*, 425: 480-484.
- Parker, G.A., Chubb, J.C., Roberts, G.N., Michaud, M. y Milinski, M. (2003b) Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 47-54.
- Pascual, S., Gestal, C., Estévez, J.M., Rodríguez, H., Soto, M., Abollo, E. y Arias, C. (1996a) Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an update perspectiva. *Aquaculture*, 142: 1-10.
- Pascual, S., González, A., Arias, C. y Guerra, A. (1996b) Biotic relationships of *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the Northeast Atlantic: evidence from parasites. *Sarsia*, 81: 265-274.
- Pascual, S., González, A., Arias, C. y Guerra, A. (1995) Helminth infection in the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda, Ommastrephidae) off NW Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 71-75.
- Quetglas, A., Carbonell, A. y Sánchez, P. (2000) Demersal continental shelf and upper slope cephalopod assemblages from the Balearic Sea (North- Western Mediterranean). Biological aspects of some deep-sea species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 50: 739-749.
- Raga, J.A. (1985) Contribución al estudio del parasitismo y demás asociaciones en los cetáceos de la Península Ibérica. Ph. D. Thesis, University of Valencia.
- Raga, J.A. (1994) Parasitismus bei den Cetacea. En: *Handbuch der Säugetiere Europas*. Band 6/I A Meeressäuger, Teil I A: Wale und Delphine I. (eds. Robineau, D., Duguy, R., y Klima, M.) Aula-Verlag Wiesbaden. pp. 132-179.
- Rauch, G., Kalbe, M. y Reusch, T.B.H. (2005) How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 1069-1075.
- Reid, J.B., Evans, P.G.H. y Northridge, S.P. (2003) Atlas of cetacean distribution in north-west European waters. *Joint Nature Conservation Committee, Peterborough*, pp 76.
- Rice, D.W. (1977) Synopsis of biological data on the Sei Whale and Bryde's whale in the eastern North Pacific. *Report of the International Whaling Commission*, Special Issue 1, 92-97.
- Riser, N.W. (1956) Early larval stages of two cestodes from elasmobranch fishes. *Proceedings of the Helminthological Society*, 23: 120-124.
- Ruhnke, T.R. (1993) A new species of *Clistobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea), with an evaluation of the systematic status of the genus. *Journal of Parasitology*, 79: 37-43.
- Ruhnke, T.R. (1994) *Paraorymatobothrium barberi* n. g., n. sp. (Cestoda: Tetraphyllidea), with amended descriptions of two species transferred to the genus. *Systematic Parasitology*, 28: 65-79.

- Ruhnke, T. R. (1996) Taxonomic resolution of *Phyllobothrium* van Beneden (Cestoda: Tetraphyllidae) and a description of a new species from the leopard shark *Triakis semifasciata*. *Systematic Parasitology*, 33: 1-12.
- Sardella, N.H., Roldán, M. y Tanzola, D. (1990) Helmintos parásitos del calamar (*Illex argentinus*) en la subpoblación Bonaerense-Norpatagónica. *Frente Marítimo*, 7 (Sec. A): 53-56.
- Shukhgalter, O.A. (1992) The cestode forms in squids from the South American oceanic waters (in the Southwestern Atlantic and Southeastern part of the Pacific). *Parazitologiya* (St. Petersburg), 26(2): 130-140.
- Simpson, J.G. y Gardner, M.B. (1972) Comparative microscopic anatomy of selected marine mammals. En: *Mammals of the Sea. Biology and Medicine*. (ed. Ridgway, S.H.). C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA. pp. 298-418.
- Siquier, G.F. y Le Bas, A.E. (2003) Morphometrical categorization of *Phyllobothrium delphini* (Cestoidea, Tetraphyllidae) cysts from Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei* (Cetacea, Delphinidae). *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 2: 95-100.
- Skrjabin, A.S. (1964) Helminth larval forms of marine mammals from Far East seas. En *Morskije Mlekopitayushchie*. Moscow: Nauka. pp. 311-316. [en Ruso].
- Skrjabin, A.S. (1970) The first finding of larvae of the cestode *Monorygma delphini* (Tetraphyllidae, Phyllobothriidae) in Antarctic whales. *Zoologicheskii Zhurnal*, 49: 1721-1722. [en Ruso].
- Skrjabin, A.S. (1972) Larvae of cestodes of the genus *Phyllobothrium* Beneden, 1850 (Tetraphyllidae), parasites of whales and other marine animals. *Parazitologiya*, 6: 426-434. [en Ruso].
- Skrjabin, A.S. y Yurakhno, M.V. (1987) The first finding of larvae of *Scolex pleuronectis* Müller, 1788 in pinnipeds. *Parazitologiya*, 21: 743-744. [en Ruso].
- Slooten, E. y Dawson, S.M. (1994) Hector's dolphin *Cephalorhynchus hectori* (van Beneden, 1881). En: *Handbook of marine mammals* (eds. Ridgway, S.H. y Harrison, S.R.), Vol: 5. Academic Press. pp 311-334.
- Smyth, J.D. (1994) Eucestoda: Minor orders. En: *Introduction to Animal Parasitology*. Cambridge University Press. pp. 296-301.
- Soares, M.L.R. (1986) Ocorrência de *Phyllobothrium delphini* (Bosc, 1802) Gervais, 1882 (Phyllobothriidae: Cestoda) em lobos marinho *Arctocephalus australis* Zimmerman, 1783 e *Arctocephalus tropicalis* Gray, 1872 (Pinnipedia: Otariidae) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. En: *Anais da 2ª Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul*. Book of Abstracts. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza, Brasil, p. 21.
- Soulier, L. (1993) Contribution à l'étude de la faune parasitaire des cétacés. Ph. D. thesis, Université Claude Bernard de Lyon.
- Southwell, T. y Walker, A.J. (1936) Notes on a larval cestode from a fur seal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 30: 91-100.
- Stossich, M. (1898) Note parassitologiche. *Bollettino della Società Adriatica di Scienze Naturali in Trieste*, 18: 1-10.
- Stunkard, H.W. (1977) Studies on tetraphyllidean and tetrahyarchidean metacestodes from squids taken on the New England Coast. *Biological Bulletin*, 153: 387-412.
- Testa, J. y Dailey, M.D. (1977) Five new morphotypes of *Phyllobothrium delphini* (Cestoda: Tetraphyllidae), their relationship to existing morphotypes, and their zoogeography. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 76: 99-110.
- Threlfall, W. (1970) Some helminth parasites from *Illex argentinus* (de Castellanos, 1960) (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Canadian Journal of Zoology*, 48: 195-198.
- Tyler, G.A. y Caira, J.N. (1999) Two new species of *Echinobothrium* (Cestoidea: Diphyllidae) from myliobatiform elasmobranchs in the Gulf of California, México. *Journal of Parasitology*, 85: 327-335.
- Van Waerebeek, K., Reyes, J.C., Read, A.J. y McKinnon, J.S. (1990) Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America. En: *The bottlenose dolphin* (eds. Leatherwood, S. y Reeves, R.R.). Academic Press, Inc. San Diego, California. 143-154 pp.

- Walker, W.A. (1981)** Geographical variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (Tursiops) in the eastern North Pacific. NOAA, NMFS, SWFC Admin. Rep. LJ-81-03C. 54 pp.
- Walker, W.A. (2001)** Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in the Northern North Pacific, Bering Sea and Sea of Okhotsk. *Marine Mammal Science*, 17: 264-275.
- Wardle, R. A. y McLeod, J. A. (1952)** *The Zoology of Tapeworms*. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Wetherbee, B.M. y Cortés, E. (2004)** Food Consumption and feeding habits. En: *Biology of sharks and their relatives*. CRC Press LLC. Pp: 223-244.
- Williams, H.H. (1968)** The taxonomy, ecology and host-specificity of some Phyllobothriidae (Cestoda: Tetraphyllidea), a critical revision of *Phyllobothrium* Beneden, 1849 and comments on some allied genera. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, no. 786, vol. 253: 231-307.
- Williams, T.M., Haun, J., Davis, R.W., Fuiman, L.A. y Kohin, S. (2001)** A killer appetite: metabolic consequences of carnivory in marine mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129: 785-796.
- Wojciechowska, A. (1993)** The tetraphyllidean and tetrabothriid cercoids from Antarctic bony fishes. I. Morphology. Identification with adult forms. *Acta Parasitologica*, 38: 15-22.

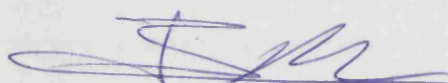
Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha
acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

D./D^a **CELIA AGUSTÍ RIDAURA**

la calificación de *SOBRESALIENTE CUM LAUDE*

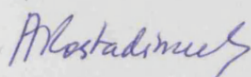
Valencia, a ...18. dediciembre..... de ...2006.....

EL/LA SECRETARIO/A,



EL/LA PRESIDENTE/A

Dr. D. Juan Antonio Balbuena Díaz-Pinés



Dr^a. D^a. Aneta Kostadinova